



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD
OAXACA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES.**

ACADEMIA DE INGENIERIA

**“Evaluación de la actividad antifúngica de
extractos de *Agave nussaviorum* obtenidos con
el uso de energías alternas”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS**

PRESENTA

I.Q. PRISCILA CHÁVEZ RUIZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LUICITA LAGUNEZ RIVERA



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

SIP-14 BIS

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 02 del mes de diciembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca** (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada: "Evaluación de la actividad antifúngica de extractos de *Agave nussaviorum* obtenidos con el uso de energías alternas",

Presentado por la alumna:

Chávez

Apellido paterno

Ruiz

materno

Priscila

nombre(s)

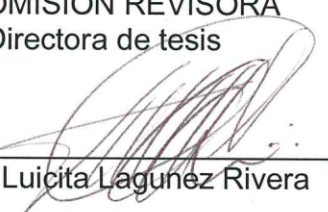
Con registro:

B	1	2	0	0	0	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron *SU APROBACION DE LA TESIS*, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

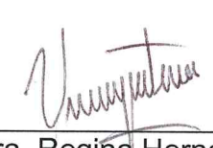
LA COMISION REVISORA
Directora de tesis


Dra. Luicita Lagunez Rivera

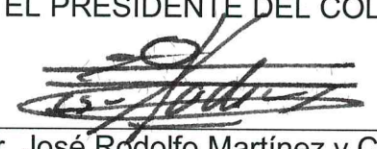

Dr. Prisciliano Felipe de Jesús Cano Barrita


Dr. Juan Alejandro Vazquez Feijoo


Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez


Dra. Regina Hernández Gama

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. José Rodolfo Martínez y Cadenas
Encargado de la Dirección
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 05 del mes diciembre del año 2014, el (la) que suscribe Chávez Ruiz Priscila, alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro B120003, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Luicita Lagunez Rivera y cede los derechos del trabajo titulado: "Evaluación de la actividad antifúngica de extractos de *Agave nussaviorum* obtenidos con el uso de energías alternas", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó iq.priscila.chavez@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Chávez Ruiz Priscila



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de la especie *Agave nussaviorum*, cuya composición química y actividad biológica aún no ha sido estudiada. Los extractos fueron obtenidos por la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y por microondas (MAE), métodos actualmente conocidos por las ventajas que proveen al disminuir el consumo de solventes, disminución del tiempo de procesamiento y obtención de un mayor rendimiento en comparación con los métodos convencionales.

Las variables estudiadas en los procesos de extracción fueron el tiempo de extracción, relación solvente:sólido, y concentración de etanol. Se encontró que en la extracción UAE la mayor cantidad de compuestos bioactivos fue obtenida con una concentración de etanol al 70%, tiempo de extracción de 110 minutos y una relación solvente:sólido de 50 mL/g, obteniendo un rendimiento de 5.38% con 269.48 mg/mL, mientras que en la extracción MAE, el mejor rendimiento se obtuvo bajo las siguientes condiciones: concentración de etanol al 95%, un tiempo de extracción de 31 minutos y una relación solvente:sólido de 5 mL/g, con un rendimiento de 5.07% con 253.83 mg/mL de compuestos bioactivos.

Ambos extractos inhibieron el crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y 9 aislados clínicos de la especie *Trichophyton rubrum*, para el extracto UAE se tuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 0.25 a 1 mg/mL, mientras que en el extracto MAE se obtuvieron CMIs de 0.4-1 mg/mL y CMF o CMB de 0.5 a 1 mg/mL.

El análisis fitoquímico mostró la presencia de compuestos fenólicos del tipo dihidroflavonoide y flavonol, que presentan actividad antimicrobiana y antioxidante; y de inulobiosa, de gran importancia por su capacidad edulcorante y la particularidad de no causar hiperglicemia.

Palabras clave: *Agave nussaviorum*, extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, actividad antifúngica

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the antifungal activity *in vitro* from extracts of the specie *Agave nussaviorum*, whose chemical composition and biological activity still not has been reported in the literature.

The extracts were obtained by ultrasound assisted extraction (UAE) and microwaves (MAE), currently know methods by the advantages provided by reducing solvent consumption, reduction of the processing time and obtaining a higher performance compared with conventional methods.

The effects studied in extraction processes were the extraction time, ratio solvent:matter and ethanol concentration. Results showed that in the UAE method the highest amount of bioactive compounds was obtained with ethanol concentration of 70%, extraction time of 110 minutes and ratio solvent:matter of 50mL/g, obtaining under these conditions a yield of 5.38% with 269.48 mg/mL of bioactive compounds, while in MAE method, the best performance is obtained under the following conditions: Ethanol concentration of 95%, extraction time of 31 minutes and ratio solvent:matter of 5:1, with a yield of 5.07% with 253.83 mg/mL of bioactive compounds.

Both extracts inhibited microbial growth of *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and 9 special clinical isolates of *Trichophyton rubrum*. The UAE extract had a CMI of 0.25 to 1 mg/mL while in the MAE extract was obtained a CMI of 0.4-1 mg/mL.

Phytochemical analysis showed the presence of phenolics compounds of the type of dihydroflavonol and flavonol, which have antimicrobial and antioxidant activity; and showed the presence of inulobiose, of great importance for their sweetening ability and the particularity of not causing hyperglycemia.

Key words: *Agave nussaviorum*, ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction, antifungal activity

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luicita Lagunez Rivera.

A los miembros de la comisión revisora, por sus valiosas aportaciones en la conclusión de este trabajo.

A la Dra. Regina Hernández Gama por su apoyo en la realización de este trabajo, por sus valiosas aportaciones y por brindarme la oportunidad de recurrir a su experiencia en un marco de confianza y amistad.

Al Dr. Leandro Machado Rocha por su apoyo, cariño y conocimientos brindados, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de su gran equipo de trabajo.

A la Dra. Bettina Monika Ruppelt por su apoyo y alegría brindados.

A la Dra. Adriana Passos de Oliveira por su valiosa ayuda en la elucidación estructural de los compuestos químicos.

A Enrique Gonzalez Venegas por su apoyo durante todos estos 2 años ¡Gracias!

A Karina Zarco Tovar por la amistad y por estar siempre ahí.

A Henrique dos Santos Almeida por la amistad y el apoyo incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio de Tecnología de Productos Naturales de la Universidad Federal Fluminense que con su amistad y alegría hicieron de mi estancia en Brasil una experiencia enriquecedora y muy agradable: Ricardo Diego, Arthur, Francisco, Diogo, Luis Armando, Paula, Mariana, Déborah, Ulrich, Beatriz y Ricardo. Muito obrigada!

Al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) Querétaro y a la Universidad Federal Fluminense de Niterói, Brasil.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 343432.

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico otorgado para la realización de esta investigación en los proyectos SIP 20141332 y SIP 20131737.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Agave nussaviorum</i> subsp. <i>nussaviorum</i>	22
Figura 2. Distribución de <i>Agave nussaviorum</i> en el estado de Oaxaca y en distritos de la Mixteca Alta	23
Figura 3. Efecto de la cavitación por ultrasonido en células de albahaca	26
Figura 4. Diferentes núcleos de flavonoides.....	33
Figura 5. Diagrama de obtención de extractos de <i>Agave nussaviorum</i>	38
Figura 6. Lector de microplacas BioTek Modelo PowerWave XS2.....	41
Figura 7. Equipo HPLC Shimadzu.....	43
Figura 8. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear.....	44
Figura 9. Interacciones entre los factores independientes y dependientes en la extracción UAE.....	47
Figura 10. Interacciones entre los factores independientes y dependientes en la extracción MAE.....	50
Figura 11. Halos de inhibición con extractos UAE y MAE.....	49
Figura 12. Concentración mínima inhibitoria con extractos MAE y UAE.....	55
Figura 13. Diagrama de aislamiento e identificación de los compuestos de <i>Agave nussaviorum</i>	56
Figura 14. CCF de los extractos MAE y UAE.....	57
Figura 15. Columna PCR conteniendo Sephadex LH-20 como fase estacionaria.....	58
Figura 16. CCF con fracciones de la columna PCR.....	58
Figura 17. CCF con fracciones PCR1.....	59
Figura 18. ESI-Q-TOF MS de la fracción PCR1 21-24.....	60
Figura 19. Espectro de RMN 2D HSQC de la fracción PCR1 7-15.....	61
Figura 20. Espectro de RMN 2D HMBC de la fracción PCR1 7-15.....	62
Figura 21. Espectro de RMN de C13 de la fracción PCR1 7-15.....	62
Figura 22. Fórmula estructural de la inulobiosa.....	64
Figura 23. CCF de fracción PCR 30-34.....	65
Figura 24. CCF del compuesto hidrolizado de fracción PCR 30-34.....	65
Figura 25. Cromatograma fracción PCR 30-34 de <i>Agave nussaviorum</i> visualizados en diferentes complementos de onda.....	68
Figura 26. Espectros de absorción de UV de las Sustancias 1-5.....	69
Figura 27. Posibles núcleos de las Sustancias 1-5.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Extracción de compuestos fenólicos usando la extracción asistida por ultrasonido...	8
Tabla 2. Aplicaciones UAE en la extracción de fitoquímicos.....	9
Tabla 3. Condiciones optimizadas en la extracción de compuestos fenólicos usando la extracción MAE.....	13
Tabla 4. Aplicaciones MAE en la extracción de fitoquímicos.....	14
Tabla 5. Fases estacionaria y móvil usadas en la purificación de compuestos fenólicos.....	35
Tabla 6. Variables independientes y su nivel correspondiente en el método UAE.....	38
Tabla 7. Variables independientes y su nivel correspondiente en el método MAE.....	39
Tabla 8. Factores y niveles evaluados en la extracción UAE.....	45
Tabla 9. Análisis de varianza para la concentración de compuestos orgánicos en el método UAE.....	45
Tabla 10. Variables de respuesta del diseño factorial completo en la extracción UAE.....	46
Tabla 11. Factores y niveles evaluados en la extracción UAE.....	48
Tabla 12. Análisis de Varianza para la concentración de compuestos orgánicos en el método MAE	48
Tabla 13. Variables de respuesta del diseño factorial completo 3x3x3 en la extracción MAE...	49
Tabla 14. Actividad antimicrobiana de los extractos mostrada en zonas de inhibición en mm..	52
Tabla 15. Actividad antifúngica de extractos MAE y UAE (CMI/CMF, mg/mL).....	54
Tabla 16. Comparación de los desplazamientos químicos de la inulobiosa y la sustancia aislada	63
Tabla 17. Tiempos de retención y picos máximos de las Sustancias 1-5	66

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

°C	Grados Celsius
Ppm	Partes por millón
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
µg	Microgramo
m	Metro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
µm	Micrómetro
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
CCF	Cromatografía en Capa Fina
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
CC	Cromatografía en Columna
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
IC50	Concentración Inhibitoria Máxima Media
CMF	Concentración Mínima Fungicida
PDA	Agar Dextrosa Papa (Potato Dextrose Agar)
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute (Roswell Park Memorial Institute Medium)
p/v	Peso/volumen
eV	electronvoltio
TMS	Tetrametilsilano
MHz	MegaHertz
DMSO	Dimetilsulfóxido
ATC	Ácido trifluoroacético

CONTENIDO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	XII
JUSTIFICACIÓN.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. ESTUDIOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LA FAMILIA AGAVACEAE	3
2.2. ANTECEDENTES DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDOS CON ENERGIAS ALTERNAS	5
2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA.....	16
2.3.1. MÉTODO M38-A2 PARA HONGOS FILAMENTOSOS.....	17
2.4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	19
3. MARCO TEÓRICO	21
3.1. FAMILIA AGAVACEAE.....	21
3.1.1. <i>Agave nussavium</i> subsp. <i>nussavium</i>	22
3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDOS POR ENERGÍAS ALTERNAS... 25	
3.2.1. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (UAE).....	25
3.2.2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE).....	27
3.2.3. TRATAMIENTOS PREVIOS A LA EXTRACCIÓN.....	28
3.3. INFECCIONES MICÓTICAS.....	30
4. HIPÓTESIS.....	36
5. OBJETIVOS	36
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	36
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
6. METODOLOGÍA.....	37
6.1. MATERIAL VEGETAL	37
6.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	37
6.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIBACTERIANA.....	39
6.3.1. MICROORGANISMOS	39
6.3.2. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD-HALO DE INHIBICIÓN.....	39

6.3.3. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	40
6.4. MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN	41
6.4.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)	41
6.4.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	42
6.4.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC-UV)	42
6.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.....	43
6.5.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI-Q-TOF-MS).....	43
6.5.2. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H Y ¹³ C.....	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	45
7.1.1. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MÉTODO UAE	45
7.1.2. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MÉTODO MAE.....	48
7.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS	51
7.3. ANÁLISIS QUÍMICOS DE LOS EXTRACTOS.....	56
8. CONCLUSIONES	71
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las dermatofitosis o tiñas son las micosis más comunes con una incidencia cada vez mayor (Arenas, 2002), siendo *Trichophyton rubrum* el agente causal hasta en el 80% de los casos (Hernández-Salazar *et al.*, 2007). Algunas levaduras del tipo *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* actualmente se encuentran entre la segunda causa principal de las micosis (Manzano-Gayosso *et al.*, 2011). *Trichophyton rubrum* es un dermatofito de gran relevancia en la salud pública puesto que es el principal causante de dermatomicosis y representa un alto porcentaje en patologías nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos y con cuadros de diabetes, sin embargo, para este hongo se han utilizado fármacos sintéticos que presentan efectos colaterales y de eficacia variable (Llambrich & Lecha, 2002).

Debido al aumento de la incidencia de infecciones micóticas, los efectos secundarios de los fármacos, el descubrimiento de patologías cada vez más complejas y la resistencia de los hongos a antifúngicos, los esfuerzos por encontrar soluciones médicas naturales son cada vez más apremiantes. Hoy en día, la medicina tradicional resurge ante la necesidad de nuevos fármacos con menores efectos adversos que las sustancias activas actualmente utilizadas (Edwards & Aronson, 2000). Algunos efectos adversos incluyen la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, anemia, náuseas entre otras (Martínez Fernández *et al.*, 1998).

JUSTIFICACIÓN

La importancia tradicional de *Agave nussaviorum subsp. nussaviorum*, comprende dos usos relevantes: el alimentario y el medicinal. Los mixtecos atribuyen al jugo de las hojas algunas propiedades curativas como auxiliar en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, las venas varicosas y las inflamaciones producidas por golpes o caídas tanto en el ser humano como en animales, sin embargo, los pobladores de la comunidad de San Pedro y San Pablo Teposcolula refieren observar la desaparición de la onicomycosis con el constante consumo de una preparación obtenida por maceración de las hojas de *Agave nussaviorum* durante 8 horas en ausencia de luz licuadas con agua.

Esta especie vegetal, hasta el momento, no cuenta con ningún estudio que avale su potencial como antifúngico en microorganismos causantes de la onicomycosis. La caracterización de la actividad biológica así como la identificación de los compuestos activos, brindará valiosa información para la confirmación del uso medicinal tradicional de *Agave nussaviorum subsp. nussaviorum*.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia farmacológica que presentan los microorganismos ante algunos compuestos activos, así como la intolerancia medicamentosa que suele presentarse en algunos pacientes genera una constante búsqueda de alternativas orgánicas y naturales de compuestos activos (Sánchez-Carazo *et al.*, 1999).

La medicina tradicional, provee un 80% de cobertura a la población mundial en los países en desarrollo, por ello, el uso de plantas medicinales para el tratamiento primario de enfermedades ha sido reconocido e impulsado por la Organización Mundial de la Salud (Villar & Villavicencio, 1992).

En México, existe una gran variedad de plantas medicinales y tienen una amplia distribución, gracias a la diversidad en las condiciones ambientales en el territorio se propician diferentes tipos de vegetación y riqueza florística (García-Mendoza, 2004). Las plantas producen metabolitos secundarios, cuyo papel no resulta primordial para el desarrollo de éstas, sin embargo se ha documentado la actividad antifúngica de alcaloides, terpenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, entre otros (Domingo & López-Brea, 2003; Abad *et al.*, 2007).

La familia Agavaceae es endémica del continente americano, siendo México el país con mayor concentración y diversificación (García-Mendoza, 2007). Los agaves deben su importancia económica y cultural a su gran aprovechamiento por nuestros ancestros y hasta nuestros días, su uso comprende desde la utilización de fibras para uso textil, para fines ornamentales, en la delimitación de terrenos como cercos vivos, como fuente de alimento; para la elaboración de bebidas alcohólicas, como combustible, como abono y como fuente medicinal en el tratamiento de trastornos que van desde inflamaciones, golpes, presión alta, diabetes, várices y padecimientos del corazón, además es usado como antiséptico, analgésico, anti-inflamatorio, antirreumático y como inhibidor del crecimiento de bacterias en el estómago e intestinos (Arias *et al.*, 2000; García-Mendoza, 2004; García-Mendoza, 2007; Debnath *et al.*, 2010; Háuad-Marroquín *et al.*, 2010). Los agaves son una fuente importante de eritroaglutininas, hecogeninas (Martínez Antonio *et al.*, 1995; Alonso, 2007), así también de saponinas, triterpenos, flavonoides, alcaloides y taninos (Fernández, 2005).

Agave nussaviorum subsp. *nussaviorum*, también llamado papalomé, papalometl y "yavi-ticushi" en lengua mixteca, es una especie nativa de México, de amplia

distribución en el sureste del país. El uso principal es ornamental, alimentario, y en la elaboración de bebidas alcohólicas y una golosina agridulce llamada en lengua mixteca "yahui ndodo". En la medicina tradicional tiene antecedente en el tratamiento de enfermedades del sistema circulatorio y como hipoglucemiante (García-Mendoza, 2010).

La actividad antifúngica de extractos de plantas ha sido ampliamente estudiada y reconocida (Saldívar *et al.*, 2003; Abad *et al.*, 2007; Barile *et al.*, 2007; Davicino *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2010), generalmente los extractos son fácilmente obtenibles, baratos, seguros, eficientes, sin embargo es necesaria mayor investigación para entender sus propiedades, seguridad y eficacia (Yadav & Agarwala, 2011).

La composición química de los compuestos activos obtenidos de las plantas medicinales puede variar entre otras causas, por el método de extracción. Los métodos basados en el uso de energías alternas resultan menos costosos y más amigables con el ambiente, pues disminuyen el uso de solventes, también disminuyen el tiempo de procesamiento y se obtiene un mayor rendimiento en comparación con los métodos convencionales (Alupului *et al.*, 2009).

A pesar de la importancia cultural de la medicina tradicional, nuestro actual conocimiento de la diversidad es insuficiente. Esta investigación complementará con estudios bioquímicos, moleculares y farmacológicos el uso medicinal tradicional de la especie *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum* en las comunidades.

Esta especie hasta el momento, no cuenta con ningún estudio que avale su potencial químico y biológico.

2. ANTECEDENTES

2.1. ESTUDIOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LA FAMILIA AGAVACEAE

Las plantas producen naturalmente una serie de compuestos denominados metabolitos secundarios, secuestrados en vacuolas u organelos de las plantas, que pueden no ser fundamentales para el crecimiento de ésta. Algunos metabolitos pueden ser constitutivos, precursores activados por ataques patógenos o daños a los tejidos, por lo tanto su concentración es proporcional al daño tisular provocado por los daños externos (Osbourn, 1996).

El uso de los agaves en México está referido desde la época prehispánica, como alimento, bebida y fuente medicinal. Las especies del género *Agave* han sido reportadas con actividades antiinflamatorias, antireumáticas, analgésicas, antibacterianas, antivirales, antituberculosas, y antimicóticas entre otras (Gupta, 1995). Diversos estudios han documentado la fitoquímica de los agaves, siendo ampliamente estudiados los compuestos primordiales para la producción del tequila y el mezcal (Alonso, 2007; Montañez-Soto *et al.*, 2011(1)).

La cantidad de azúcares presentes en los agaves representa un gran porcentaje en la composición de éstos, cuya importancia radica en la utilización de los azúcares para la fermentación en la obtención de etanol. Wesche (2000), reportó la presencia de polímeros de fructosa como la inulina en agaves como reserva de carbohidrato. Estudios han demostrado experimentalmente que la combinación prebiótica de inulina y oligofructosa es capaz de prevenir la colitis por producir cambios en la microflora intestinal al estimular el crecimiento de poblaciones bifidobacterianas en las regiones próximas al colon (Hoentjen *et al.*, 2005; Allsopp *et al.*, 2013). Montañez Soto *et al.*, 2011 (2) realizaron extractos acuosos de cabeza, hojas maduras (bases y puntas), hojas secas y hojas jóvenes de *Agave tequilana* Azul encontrando que la mayor concentración de carbohidratos, azúcares reductores totales, inulina, fructooligosacáridos, y azúcares reductores directos se encuentran en la cabeza y las bases de las hojas maduras (Bautista-Justo *et al.*, 2001; Armando-Ulloa *et al.*, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los principales metabolitos secundarios asociados a la actividad antifúngica y antimicrobiana son los terpenoides, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, entre otros (Aqil *et al.*, 2010).

La presencia de compuestos fenólicos en agaves ha sido documentada en publicaciones donde se destaca su importancia como marcadores quimiotaxonómicos. Ejemplo de ello es la investigación de Almaraz-Abarca *et al.*, 2009 quienes identificaron los compuestos presentes en polen y hojas de *Agave duranguensis*, *Agave asperrima*, *Agave shrevei*, *Agave shrevei* subsp. *matapensis* y *Agave wocomah* encontrando kaempferol, mirircetina-3-o-ramnosideo, quercetina, Kaempferol-3-O-glucosideo, Kaempferol-3-O-[glucosil(1-2)glucosideo]. De igual manera Almaraz-Abarca *et al.*, 2013, evaluaron el complejo *Agave victoriae-reginae*, *Agave lechuguilla* y *Agave striata* donde hallaron compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, flavonas dihidroflavonoides y derivados de quercetina. Estudios biológicos previos han descrito las propiedades antimicrobianas del kaempferol ramnosideo contra aislados de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Cryptococcus neoformans*, siendo reconocido por su potencial antioxidante y por su capacidad para formar un complejo con la pared celular de las bacterias o levaduras inhibiendo el crecimiento microbiano (Tatsimo *et al.*, 2012). De igual manera algunos estudios han demostrado que los flavonoides: mirircetina y quercetina y kaempferol presentan actividad antimicrobiana contra cepas de *Candida spp.*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexneri*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum gypseum*; estos resultados son alentadores pues podrían considerarse como nuevos agentes antifúngicos puesto que su efectividad es comparable con la obtenida con los antifúngicos de uso comercial (Koc *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2011; Pasetto *et al.*, 2014).

2.2. ANTECEDENTES DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDOS CON ENERGÍAS ALTERNAS

Entre los diversos métodos de extracción que se han estudiado y mejorado a lo largo del tiempo, los procesos que emplean energías alternas como las microondas, el ultrasonido, los fluidos supercríticos, entre otros, proveen grandes beneficios comparados con los métodos convencionales de extracción (extracción por Soxhlet, la maceración, la percolación, entre otras) pues disminuyen los tiempos de extracción y reducen el tiempo de exposición al calor de los compuestos de interés evitando su degradación, así también, aumentan el rendimiento de algunos fitoquímicos (Zhao *et al.*, 2006). Las nuevas tecnologías son reconocidas por ser amigables con el ambiente pues reducen el uso de solventes usados en extracciones convencionales y que son potencialmente tóxicos (Li *et al.*, 2004).

a) EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (UAE)

La extracción asistida por ultrasonido (Ultrasound Assisted Extraction, UAE) ha sido ampliamente reconocida por su uso potencial en extracciones de compuestos herbales en el campo fitofarmacéutico y/o alimentario *v. gr.* proteínas, aceites esenciales, compuestos fenólicos, pigmentos, antocianinas, polisacáridos, compuestos aromáticos, entre otros. Distintos métodos de extracción convencionales han sido usados para la obtención de metabolitos secundarios, como la maceración, la decocción y la extracción por Soxhlet, sin embargo el método UAE se ha caracterizado por brindar mayores ventajas en términos de rendimientos y reducción de costos experimentales (menor tiempo de extracción, menor energía requerida y menor equipamiento) (Vinatoru, 2001). Estudios previos han demostrado que el rendimiento de extracción de los metabolitos secundarios está fuertemente ligado a la técnica de extracción, la polaridad del solvente y la temperatura (Ghasemzadeh *et al.*, 2014).

Generalmente los compuestos fenólicos y flavonoides son obtenidos por extracción en Soxhlet y maceración, sin embargo las altas temperaturas usadas por un largo tiempo en la extracción en Soxhlet conllevan a la degradación de los metabolitos mientras que la extracción por maceración es caracterizada por la baja eficiencia de extracción. Los métodos convencionales presentan algunas desventajas como la oxidación, hidrólisis o ionización de los metabolitos que generalmente son minimizados en el método UAE debido a las temperaturas bajas en las cuales se lleva a cabo la cavitación (Wang *et*

al., 2012). La extracción UAE es uno de los métodos más simples y económicos que pueden ser operados rápidamente y representan un gran ahorro en el uso de solventes (Khoddami *et al.*, 2013; Kuo *et al.*, 2014). La extracción UAE ha sido empleada para la rápida extracción de antioxidantes, licopenos, carotenoides, compuestos fenólicos y flavonoides obteniendo excelentes resultados (Kuo *et al.*, 2014). Generalmente, la extracción asistida por ultrasonido es afectada por algunos parámetros que influyen en los rendimientos obtenidos, como la potencia ultrasónica, el tiempo y temperaturas de extracción y concentración de solventes, por ello, es importante el control de estos parámetros. La **Tabla 1** presenta el rendimiento obtenido de algunos compuestos fenólicos bajo diferentes métodos de extracción, mientras que la **Tabla 2** concentra los resultados obtenidos en algunas investigaciones usando la extracción asistida por ultrasonido.

Una investigación encaminada a la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de flavonoides de *Sparganium stoloniferum*, una especie usada en la medicina tradicional china para el tratamiento de dismenorrea y estasis de sangre, evaluó 3 condiciones en el método de extracción: concentración de etanol (40, 50 y 60%), tiempo de ultrasonificación (20, 30 y 40 min) y potencia ultrasónica (240, 270 y 300W). Los resultados mostraron que una solución de etanol-agua al 53.62%, un tiempo de 29.41 minutos y potencia ultrasónica de 300W se obtuvo la mayor concentración de flavonoides con 6.30 mg/g. La identificación molecular por HPLC mostró que los flavonoides extraídos con el método UAE fueron: kaempferol, rutina y formononetina (Wang *et al.*, 2012). Khan *et al.*, en 2010 realizaron extracciones de polifenoles de cáscaras de cítricos, usando un equipo ultrasónico con una frecuencia de 25 kHz y 150 W de potencia, los resultados arrojaron una eficiencia en la extracción de polifenoles 30% mayor que la obtenida por una extracción convencional, las ventajas observadas en la comparación de ambos métodos fueron el corto tiempo de extracción y una mayor eficiencia. La cromatografía aplicada a los extractos demostró que el ultrasonido no interfiere en la naturaleza de los compuestos y por lo tanto tampoco modifica la capacidad antioxidante de los fenoles obtenidos. De igual manera un estudio mostró que la actividad anticancerígena de los extractos de árbol de curry asistidos por ultrasonido está asociada a la cantidad de flavonoides extraídos y por ende a la optimización en la extracción de éstos. La optimización de la extracción indicó que la potencia ultrasónica (145.52 W), la concentración de metanol (80%) y la temperatura de extracción (55.9°C) afectaron significativamente el rendimiento de

extracción de los flavonoides y consecuentemente la actividad antioxidante de los extractos (Ghasemzadeh *et al.*, 2014).

La extracción asistida por ultrasonido también ha sido aplicada en la obtención de fructo-oligosacáridos prebióticos, de gran interés por su efectividad en el tratamiento de enfermedades en el colón (Milani *et al.*, 2011). Jovanovic-Malinovska *et al.*, (2015) buscaron el mejoramiento de las condiciones en la extracción UAE de oligosacaridos de algunas frutas. La investigación evaluó la selección y concentración del solvente (acetona 60%, etanol 60% y metanol 60%), el tiempo de extracción (5 a 30 min) y la temperatura de extracción (20 a 60°C). Las condiciones óptimas de la extracción UAE fueron: concentración de etanol 63%, a 40°C por 10 min de sonicación con un rendimiento de 7.95 g/100g de materia fresca, mientras que en la extracción convencional por agitación, se obtuvo un rendimiento de 1.96 g/100g de materia fresca. El rendimiento obtenido en el método UAE se atribuyó a la hidrólisis enzimática de los fructanos y de algunas moléculas con un alto grado de polimerización.

Tabla 1. Extracción de compuestos fenólicos usando la extracción asistida por ultrasonido
(Khoddami *et al.*, 2013)

REFERENCIA	MUESTRA	METABOLITOS	CONDICIONES MÉTODO UAE	CONDICIONES MÉTODO CONVENCIONAL	RENDIMIENTO UAE (mg EAG /g)	RENDIMIENTO CONVENCIONAL (mg EAG/g)
Kalpana <i>et al.</i> , 2008	<i>Potentilla atrosanguinea</i>	Fenoles totales	Etanol 50% 60 min	Etanol 50% 8 horas	27.80	30.7
Lu <i>et al.</i> , 2012	<i>Rhus chinensis</i>	Taninos	Etanol 70% 40 min	Etanol 70% 2 horas	491.2	540.5
Wu <i>et al.</i> , 2012	<i>Pueraria lobata</i>	Isoflavonas	Etanol 80% 55 min	---	128	---
Casazza <i>et al.</i> , 2010	<i>Vitis vinifera</i>	Fenoles totales y flavonoides	Metanol 60 min	Metanol 19 horas	55.90	38.8
Khan <i>et al.</i> , 2010	<i>Citrus sinensis</i>	Fenoles totales	Etanol 80% 60 min	Etanol 80% 60 min	2.758	2.05
Taha <i>et al.</i> , 2011	<i>Helianthus annuus</i>	Fenoles totales	Acetona 80% 30 min	Acetona 80% 60 min	30.93	18.02
Rostagno <i>et al.</i> , 2003	<i>Glycine max</i>	Isoflavonas	Etanol 40-60% 20 min	---	1.353	---

*EAG: Equivalente a ácido gálico.

Tabla 2. Aplicaciones UAE en la extracción de fitoquímicos

REFERENCIA	OBJETIVO	CONDICIONES Y VARIABLES EVALUADAS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Zhu & Fu, 2012	Optimización de las condiciones de extracción UAE de proteínas obtenidas de semillas de <i>Perilla frutescens</i> .	Disruptor celular ultrasónico Potencia: 60,79 y 80W Tiempo: 8, 10 y 12 min Relación líquido/sólido: 20, 30 y 40 mL/g Temperatura: 40, 50 y 60°C	Optimización a 61 W, tiempo de extracción de 12 min, relación líquido-sólido 40 mL/g y temperatura de extracción de 40°C.	Bajo condiciones óptimas se logró obtener un rendimiento de proteínas del 10.77%
Zhang <i>et al.</i> , 2010	Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de proteínas de residuos de almendra	Baño ultrasónico (40 kHz, 160W) pH: 9, 10 y 11 Relación líquido/sólido: 20, 30 y 40 mL/g Temperatura: 30, 35 y 40°C	Mayor eficiencia en la extracción de proteínas (69%) se presentó con: temperatura de extracción a 37°C, valor de pH 10.1 y relación líquido-sólido 1:29.5 mL/g	Usando el método de superficies de respuesta (RSM), se concluyó que la variable que mayor contribución tuvo en el experimento fue la temperatura de extracción, las variables con menor repercusión fueron el pH y la relación líquido-sólido.
DaPorto <i>et al.</i> , 2013	Comparación del método de extracción UAE con el método convencional (Soxhlet) en la extracción de aceite y polifenoles de semillas de <i>Vitis</i>	-Soxhlet 6 h, 70°C -Sonda ultrasónica a 20 kHz Potencia: 50, 100 y 150W 30 min a 30°C	Mejoramiento de la extracción UAE a 150 W por 30 min con un rendimiento de aceite de 14%, comparable con el obtenido por Soxhlet a 70°C por 6 h. En la obtención de compuestos fenólicos,	Las ondas ultrasónicas no tuvieron ningún efecto significativo en la calidad del aceite y ácidos grasos. En la extracción de compuestos fenólicos, el rendimiento fue menor al realizar una doble extracción por ultrasonido que

	<i>vinífera</i> L.		comparando con la maceración y Soxhlet, el método de UAE rindió cantidades equiparables en un menor tiempo y con un menor consumo de solventes.	puede deberse a que la sonicación causa degradación
Hemwimol <i>et al.</i> , 2006	Determinación de la eficiencia de extracción de antraquinonas de <i>Morinda citrifolia</i> en la extracción UAE.	-Baño ultrasónico 38,5 kHz Temperatura: 25,45 y 60°C Potencia:15.7, 39.7 y 56.1W Solvente: etanol, metanol, acetona y acetonitrilo Tiempo: 15,30,45,60 y 90 min	La mayor eficiencia de extracción se presentó con 60 min de extracción, 56.1W de potencia a 60°C usando una mezcla de etanol:agua (50:50) como solvente.	El rendimiento obtenido por UAE de antraquinonas de <i>Morinda citrifolia</i> fue de 95.72%, siendo este valor comparable con el rendimiento del 97.74% en la extracción por Soxhlet por 4 h.
Yang <i>et al.</i> , 2013	Determinación de las mejores condiciones en la extracción UAE de baicalina y baicaleína de <i>Scutellaria baicalensis</i> .	Baño ultrasónico (40 kHz y 185W) Tiempo: 5-60 min Relación solvente/sólido: 6-22 mL/g Conc. etanol: 0-100% Tamaño de partícula: 0.21-0.925 mm Temperatura: 30-80°C	Las mejores condiciones de extracción se presentaron con: tamaño de partícula de 0.355 mm, 10 mL/g, temperatura de extracción de 60°C para la baicalina y 30°C para la baicaleína, la concentración de solventes fue de 40% etanol-agua para la baicalina y 50% para la baicaleína, el tiempo de extracción fue de 10 min.	El porcentaje de extracción de baicaleína en un tiempo de 20 min (67.04%) fue mayor comparada con la obtenida por extracción con Soxhlet a 60 min y 80°C (55.17%) mientras que en la extracción de la baicalina el porcentaje de extracción fue de 52.31% y en la extracción con Soxhlet de 37.22%

Zhao <i>et al.</i> , 2006	Evaluación de la influencia de factores en la extracción asistida por ultrasonido de saikosaponinas de raíces de <i>Bupleurum scorzone-raefoliumwila</i>	Homogeneizador ultrasónico (600 W, 20kHz, sonda ultrasónica de 12.7 mm) Tiempo: 15-150 min Temperatura: 40-80°C Potencia: 0-30W Tamaño de partícula: <0.3, 0.3-0.45, 0.45-0.9 Relación solvente/sólido: 15-50 mL/g Concentración de etanol/agua: 30-70% v/v	La mejor eficiencia en los rendimientos de extracción se obtuvo bajo las siguientes condiciones: 30 min de extracción, a 80°C, tamaño de partícula de 0.3-0.45 mm, relación solvente-sólido de 25 mL/g y una concentración del solvente de 50% (v/v) de etanol-agua. Por lo tanto la extracción asistida por ultrasonido fue 6 veces más rápida comparable con una extracción convencional.	30 min de UAE rindieron una cantidad de saikosaponinas similar a la obtenida en 180 minutos por el método de extracción convencional, por lo tanto la cantidad de saikosaponinas por UAE fue 47% mayor que por el método convencional. Imágenes de la materia vegetal obtenidas por microscopio electrónico de barrido hicieron evidente los efectos de la cavitación por las ondas ultrasónicas, pudiendo observarse la disrupción de células que facilitaron la liberación de saikosaponinas.
------------------------------	--	---	---	---

b) EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

Numerosas investigaciones se han centrado en la extracción asistida por microondas (Microwave Assisted Extraction, MAE) para la obtención de compuestos activos y metabolitos secundarios de variadas especies vegetales, como aceites esenciales, fenoles, carbohidratos, ácidos grasos, saponinas, polisacáridos, entre otros (**Tabla 4**). Algunas ventajas de la extracción MAE contemplan el uso de solventes a altas temperaturas que penetran con mayor facilidad en la matriz y extraen los compuestos de las células vegetales, la reducción del uso de solventes orgánicos, la reducción de tiempos de extracción (generalmente menor a 30 min) y el incremento en los rendimientos de extracción. Los solventes polares presentan altas constantes dieléctricas que pueden absorber con mayor eficiencia las microondas, obteniendo altos rendimientos de compuestos fenólicos (Khoddami *et al.*, 2013). La **Tabla 3** reúne algunos trabajos encaminados a la obtención de compuestos fenólicos con la extracción asistida por microondas.

Resulta de gran importancia la investigación realizada por Pan *et al.*, (2003) en la cual se evaluó el método MAE en la extracción de polifenoles y cafeína de hojas de té verde (*Thea sinensis* L.). La peculiaridad del trabajo radica en que a diferencia de otras investigaciones, ésta se llevó a cabo en un horno de microondas doméstico de 700 W modificado para la operación. Se realizaron mezclas de las hojas con etanol-agua y fueron irradiadas en el siguiente orden: 45 s encendido, 10 s apagado, 3 s encendido y 10 s apagado, repitiendo este ciclo hasta alcanzar el tiempo de extracción establecido, evitando de esta manera la ebullición de la solución. El análisis de los resultados indicó que el factor que influye significativamente en la extracción de polifenoles y cafeína fue la concentración de etanol-agua, siendo el 50% (v/v) la concentración en la cual se obtuvo una mayor cantidad de compuestos, de igual manera se observó que mientras la concentración de etanol aumenta hasta 100%, la concentración de polifenoles y cafeína disminuye drásticamente. Respecto al tiempo de extracción, la cantidad de polifenoles y cafeína incrementó a la par del tiempo de extracción, alcanzando la máxima tasa a los 4 min, tiempo en el cual posteriormente se mantuvo el mismo rendimiento. El efecto de la relación líquido-sólido (mL/g) mostró que cuando los valores son bajos, los rendimientos obtenidos son muy bajos, por lo tanto, mientras mayor es la relación líquido-sólido la cantidad de polifenoles y cafeína aumenta, siendo la relación 20:1 (mL/g) la óptima para la extracción. El efecto de la elección de

solventes también fue evaluado, para ello 4 solventes fueron probados encontrando los mejores rendimientos en la extracción en el siguiente orden: metanol, agua, etanol y acetona, sin embargo al agregar 50% de agua en cada solvente se observó que el etanol-agua (1:1) provee la mayor extracción por encima de los otros solventes probados y es un solvente no tóxico.

La extracción de compuestos fenólicos de té negro fue evaluada con el método MAE, donde consideraron entre las variables de extracción la potencia del microondas (450, 600 y 900 W), el tiempo de extracción (30 a 210 s) y la relación solvente/sólido (10 a 200 mL/g). Las mejores condiciones de extracción se encontraron con 900W de potencia, 50 mL/g de materia sólida y 90 s de extracción. Los resultados mostraron que la concentración de fenoles después de 90 s de extracción fue 43% mayor que la obtenida por el método de infusión después de 210 s según el análisis estadístico, ni la potencia ni el tiempo de extracción influyeron significativamente en la capacidad antioxidante (Spigno & De Faveri, 2009).

Tabla 3. Condiciones optimizadas en la extracción de compuestos fenólicos usando la extracción MAE (Khoddami *et al.*, 2013)

REFERENCIA	ESPECIE	METABOLITOS	CONDICIONES OPTIMIZADAS DE OPERACIÓN
Gao <i>et al.</i> , 2006	<i>Saussurea medusa</i>	Flavonoides	Etanol 80% 60 min 1200 W 80°C 50 mL/g
Song <i>et al.</i> , 2011	<i>Ipomoea batatas</i>	Fenoles totales	Etanol 53% 2.05 min 302 W 30 mL/g
Liu <i>et al.</i> , 2006	<i>Angelica sinensis</i>	Ácido ferúlico	Etanol 90% 9 min 850 W 6 mL/g
Longares-Patron <i>et al.</i> , 2006	Vainilla	Vainillina	Etanol 70% 20 min 150 W 25 mL/g
Inglett <i>et al.</i> , 2010	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Fenoles totales	Etanol 50% 15 min 150 W 50 mL/g
Wang <i>et al.</i> , 2010	<i>Thea sinensis</i>	Polifenoles	Etanol 60% 10 min 80°C 600 W 12 mL/g
Casazza <i>et al.</i> , 2010	Vitis vinifera	Fenoles totales Flavonoides	Metanol 100% 60 min 110°C 60W 5 mL/g

Tabla 4. Aplicaciones MAE en la extracción de fitoquímicos.

FUENTE	OBJETIVO	CONDICIONES Y VARIABLES EVALUADAS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Hao <i>et al.</i> , 2002	Implementación de un nuevo método de extracción asistida por microondas para la extracción de artemisinina de <i>Artemisia annua</i> L.	Microondas con unidad de reflujo Tiempo: 2, 4, 5, 8, 10 y 12 min Solvente: Solvente de aceite No. 120, etanol, triclorometano, n-hexano, éter, ciclohexano. Constante dieléctrica: 1.89-2.05 ϵ Tamaño de partícula: 0.45- <0.125 mm Relación solvente/sólido: 3.33-11.6 mL/g.	Las mejores condiciones del método de extracción de artemisinina fueron: 12 min de radiación, solvente de aceite No. 120, constante dieléctrica 2.05 ϵ , tamaño de partícula menor a 0.125 mm y relación líquido-sólido 11.3 mL/g.	En comparación con el método de extracción por Soxhlet por 12 y 6 h (75.2% y 60% rendimiento respectivamente), extracción por fluidos supercríticos con CO ₂ por 2.5 y 2 h (30.8% y 33.2% de rendimiento respectivamente) y extracción por agitación normal por 2 h (52.7%), la extracción asistida por microondas por 12 min presentó mejores resultados (Rendimiento del 92.1%). Se obtuvo una mayor tasa de extracción en un menor tiempo.
Garofulic <i>et al.</i> , 2013	Evaluación la influencia del método MAE en el aislamiento de antocianinas y ácidos fenólicos de cerezas <i>Prunus cerasus</i> var. Marasca.	Microondas focalizado a 2450 MHz de frecuencia con nivel de potencia ajustable. Tiempo: 3- 14 min Temperatura: 43-77°C Potencia: 300- 500W	Mejores condiciones del método de extracción de antocianinas a 60° C y un tiempo más corto (6 -9 min) mientras que para los ácidos fenólicos el mayor rendimiento de extracción fue a 70°C y tiempo de irradiación de 10 min.	En comparación con la extracción convencional, MAE demostró mayor eficacia para todos los compuestos estudiados. La principal ventaja del uso de microondas es la extracción de misma cantidad de fitoquímicos que en una extracción convencional en un menor

				tiempo.
Wang <i>et al.</i> , 2007	Optimización de las condiciones en la extracción MAE de pectina de bagazo de manzana deshidratado.	Microondas experimental con agitación y refrigerante de 2450 MHz Tiempo: 10.6, 14 y 17.5 min pH: 1.22, 1.5 y 1.78 Relación sólido/líquido: 0.0333, 0.0452 y 0.0571 g/mL Potencia: 320, 450 y 580W	Optimización del método de extracción de pectina a 20.8 min, pH 1.01, relación sólido-líquido 0.069 y potencia de microondas a 499.4 W. El rendimiento de pectina fue de 0.316 g de 2 g de bagazo de manzana deshidratado.	El análisis estadístico indicó que el pH, tiempo de extracción y potencia del microondas tuvieron efectos significativos en el rendimiento de pectina.
Li <i>et al.</i> , 2012	Implementación y optimización de MAE en la extracción de compuestos fenólicos de tomate <i>Solanum lycopersicum</i>	Equipo de microondas de 100 W Temperatura: 63.19, 70, 80 y 90°C Tiempo: 0.32, 1, 2 y 3 min Concentración de etanol: 26.36, 40, 60, 80 y 93.64% v/v	Optimización a 96.5°C, 2.06 min, 66.2% etanol-agua para el poder antioxidante reductor férrico y 96.5°C, 1.66 min, 61.1% etanol-agua para la capacidad de absorción de radicales oxígeno, ambos son ensayos para análisis de la actividad total antioxidante de compuestos fenólicos.	El análisis del método MAE indicó que temperaturas altas y tiempos cortos de extracción son más efectivos en la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes de tomate.

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos taxonómicamente relacionados que tienen la capacidad de producir infecciones en la piel, el pelo y las uñas tanto del ser humano como de los animales, siendo tres géneros antropofílicos los principales causantes de las dermatofitosis: *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum* (Chabasse & Pihet, 2008). Las dermatofitosis son micosis superficiales que, aunque suelen estar restringidas al estrato córneo de la piel y sus apéndices, también pueden afectar la dermis y el tejido subcutáneo (García-Martos *et al.*, 2010).

Trichophyton rubrum es el principal hongo queratinofílico causal de la tiña del pie, la onicomycosis y la tiña crural, así como *Trichophyton mentagrophytes var interdigitale* y *T. tonsurans*. No obstante, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans* han tomado importancia por la presencia en cuadros de onicomycosis en manos de mujeres adultas (Manzano-Gayosso *et al.*, 2011).

Diversos métodos encaminados a la evaluación de susceptibilidad de microorganismos a ciertos extractos han sido evaluados por técnicas microbiológicas ampliamente estudiadas, sin embargo, la estandarización de estos métodos resulta de gran importancia, pues los resultados son reproducibles y sustentados de manera más crítica (CLSI, 2009).

La necesidad de estandarizar parámetros metodológicos (temperatura y tiempo de incubación, concentración de inóculo, punto de lectura, medio de cultivo, entre otros) en ensayos para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de hongos patógenos a antifúngicos ha sido asociada a las discrepancias en puntos de corte, reproducibilidad y confiabilidad en los resultados donde se pretende evaluar concentraciones mínimas inhibitorias (Ghannoum *et al.*, 2004). Los inicios de la estandarización de métodos *in vitro* reproducibles que sirvieran de guía para el tratamiento antifúngico se deben al National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de Estados Unidos, actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Inicialmente se estudiaron las levaduras patógenas de mayor importancia y tiempo después los hongos filamentosos (Fothergill, 2012).

El primer protocolo establecido de referencia para determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro* en las levaduras fue el M27-P, posteriormente se propuso el método de dilución en caldo para levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*

neoformans, que se fue perfeccionando para dar lugar al documento M27-A3, el cual hace referencia tanto a métodos de microdilución como de macrodilución en medio líquido usando como medio de cultivo el RPMI con glucosa (CLSI, 2008). Los parámetros actuales del método M27-A3 incluyen el uso del medio RPMI, un tamaño de inóculo de 2.5×10^3 UFC/ml y una determinación de las CMI a las 48 horas para una mejor interpretación de la lectura (Lacasa *et al.*, 2007).

Por otra parte, el documento M38-A2, fue creado como un nuevo método para la evaluación de pruebas de susceptibilidad para hongos filamentosos publicado en el 2002, éste es casi idéntico al M27-A3 a excepción de algunas consideraciones como el tamaño del inóculo, que se determina espectrofotométricamente a una mayor concentración ($0.4-5 \times 10^4$ UFC/ml) (Fothergill, 2012).

El método M38-A2 a diferencia del M27-A3, presenta algunos parámetros metodológicos que no están bien definidos para la mayoría de hongos filamentosos, caso contrario con especies de *Candida* que han sido estudiadas más a fondo en el documento M27-A3 que se sigue con escuetas modificaciones.

2.3.1. MÉTODO M38-A2 PARA HONGOS FILAMENTOSOS

Para el método M38-A2, se consideran los siguientes parámetros para hongos filamentosos del género *Trichophyton*:

a) Medio de cultivo

Aun cuando *T. rubrum* crece bien en la mayoría de los medios de cultivo, se ha observado un mejor crecimiento en agar dextrosa papa (PDA) con harina de maíz, pues además de estimular la esporulación del dermatofito, estimulan la producción de pigmentos hidrosolubles de color rojo vino característicos de *T. rubrum* (Santos & Hamdan, 2005), caso contrario al comportamiento observado en agar dextrosa Sabouraud, donde el crecimiento es relativamente lento y la producción de pigmentos no es intensa (Koneman & Allen, 2006).

b) Caldo de cultivo de análisis

Los documentos del CLSI y de la comunidad europea (EUCAST) coinciden en que el medio RPMI-1640 es el más adecuado para realizar las microdiluciones, incorporando glucosa para facilitar el crecimiento de hongos (Barros *et al.*, 2006; Fothergill, 2012).

La influencia de medios de cultivo en el análisis de susceptibilidad antifúngica en *T. rubrum* fue analizada probando tres caldos de cultivo: RPMI 1640, McVeigh & Morton y caldo dextrosa Sabouraud (SDB). Los resultados del estudio mostraron que al ser mantenidos los aislados en solución salina antes de ser sembrados en placas de agar PDA, se promueve la producción de conidios y permite que el inóculo esté compuesto de estas estructuras, de igual manera, el medio RPMI-1640 fue el que mejor producción de conidios mostró (Santos & Hamdan, 2005).

c) Tiempo y temperatura de incubación

El tiempo y temperatura de incubación es otro punto de discrepancia en estudios de sensibilidad antifúngica y que puede conllevar algunos problemas como pobres crecimientos de hongos que pueden confundirse con inhibición de crecimiento, dando valores de concentraciones mínimas inhibitorias falsas.

La validación del método de referencia para la determinación de la sensibilidad antifúngica de dermatofitos clínicos aislados fue analizada por Ghannoum y otros en 2004, para ello seleccionaron como medio de cultivo el RPMI-1640, con incubación de 4 días a 35°C como parámetros óptimos, sin embargo, 4 días podrían no ser suficientes para el crecimiento idóneo de *T. rubrum*, pues la formación de conidios es lenta y pobre. Por otra parte diversos estudios coinciden que con 7 días de incubación *T. rubrum* presenta un crecimiento suficiente para visualizarse en pozos de las microplacas (Santos & Hamdan, 2005). Fernández-Torres y colaboradores en 2002, evaluaron las condiciones de optimización para el análisis de susceptibilidad antifúngica de dermatofitos, para ello evaluaron 3 tiempos de incubación (3, 7 y 14 días) y 2 temperaturas (28 y 37°C), encontrando que a 28°C y 7 días de incubación se obtuvieron mejores resultados pues a 37°C no se observaron diferencias significativas en la densidad del inóculo, mientras que a 28°C se observó una alta reproducibilidad. De igual manera, Santos & Hamdan evaluaron diferentes tiempos (4, 7 y 10 días) y temperaturas de incubación (28 y 35°C), encontrando que a 28°C y 7 días de incubación se observó el mejor crecimiento y formación de conidios.

2.4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

El aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios no son procedimientos estandarizados que pueden ser realizados para todas las clases de fenoles. Los procedimientos a seguir dependen de la naturaleza de la muestra y de la extracción de los compuestos deseados (extracción total de compuestos fenólicos, especies poliméricas, clases específicas de fenoles), el objetivo del análisis (elucidación estructural o cuantificación) y la disponibilidad de las técnicas (Santos-Buelga *et al.*, 2012). Algunos compuestos son volátiles, termolábiles y sensibles a la oxidación. La cromatografía es de los métodos más empleados en el aislamiento y análisis de compuestos, pues permite llevar a cabo un escaneo general de los extractos.

La purificación de flavonoides y compuestos fenólicos ha sido ampliamente investigada en el género *Erythroxylum* perteneciente a la familia *Erythroxylaceae*, conocido por la gran producción de alcaloides tropánicos, terpenos y sus flavonoides, pues son utilizados como marcadores taxonómicos del género. Ya han sido aislados e identificados diversos flavonoides en este género, como la quercetina y sus derivados glicosilados rutina, isoquercitrina, kaempferol y los derivados glicosilados kaempferol 3-O-rutinosideo, kaempferol 3-O-ramnosideo (Bohm *et al.*, 1988). Han sido aislados también el ombuin y sus derivados glicosilados, mirircetina y sus derivados glicosilados y la dihidroquercetina. De acuerdo con Bohm *et al.*, (1981), los flavonoides pueden ser aislados con hojas secas y trituradas usando metanol 80% en agua. El fraccionamiento por cromatografía en columna se lleva a cabo utilizando una proporción de metanol en agua como fase móvil y Sephadex-LH20® como fase estacionaria, posibilitando con ésto el fraccionamiento de los flavonoides glicosilados. Posteriormente es realizada una partición en columna usando celulosa microcristalina, agua como fase estacionaria y proporciones de éter de petróleo con acetato de etilo hasta acetato de etilo al 100% para el aislamiento de flavonoides monoglicosilados. Para aislar los flavonoides diglicosilados, el eluyente consta de proporciones de acetato de etilo en butanona.

Perera *et al.*, (2012) también identificaron flavonoides a través de la extracción de hojas secas utilizando como solventes hexano seguido de cloroformo, acetato de etilo y n-butanol. Cada extracto bruto obtenido fue hidrolizado en ácido clorhídrico. El producto obtenido de la hidrólisis fue sometido a HPLC en columna (250x4,6mm.5mm) de fase reversa de C18 a 30°C equipado con detector de UV-visible a 365 nm. Las

fases móviles fueron soluciones de 5% de CH₃CN en agua (Fase A) y 50% CH₃CN en agua (Fase B). Quercetina, kaempferol y miricetina fueron usados como padrones de agliconas. Para la purificación e identificación de los flavonoides, el extracto bruto butanólico fue solubilizado en metanol y fraccionado en columna de Sephadex-LH20® eluída con metanol. El análisis estructural fue efectuado a través de espectrometría de UV-visible y Resonancia Magnética Nuclear usando DMSO como solvente y TMS para calibrar el espectro.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. FAMILIA AGAVACEAE

La familia Agavaceae, con nueve géneros: *Agave* L., *Beschorneria* Kunth, *Furcraea* Vent., *Hesperaloe* Engelm, *Hesperoyucca*, *Manfreda* Salisb., *Polianthes* L., *Prochnyanthes* S. Watson y *Yucca* L. (García-Mendoza, 2004) y 342 especies (Rodríguez *et al.*, 2008) es endémica del continente americano, cuyo centro de origen es el Valle de Tehuacán en el estado de Puebla. Se distribuye en zonas áridas o semiáridas desde los límites de Canadá hasta Bolivia, incluyendo las islas del Caribe (García-Mendoza, 2002).

El género *Agave* presenta un engrosamiento por capas de grasa y cutina en la cutícula, impidiendo tanto la entrada como la salida del agua, llevando a cabo el metabolismo ácido crasuláceo teniendo la capacidad de absorber CO₂ y liberar O₂ y vapor de agua durante la noche, a temperaturas bajas y humedades relativas altas, provocando una pérdida mínima de agua por la apertura de estomas durante el día (Arias *et al.*, 2000). Los agaves presentan periodos de vida largos, puesto que las especies grandes de agave alcanzan su madurez entre los 10 y 25 años, en el caso de las especies pequeñas, su crecimiento demora de 4 a 5 años (García-Mendoza, 2007).

El género *Agave* se concentra mayormente en México, siendo el principal centro de domesticación y diversificación (García-Mendoza, 2007), donde se encuentran 252 especies, de las cuales, 177 son endémicas y 15 especies se emplean para la elaboración de bebidas alcohólicas, entre las que destacan *A. angustifolia* y *A. tequilana* (Torres *et al.*, 2005).

En Oaxaca, el género *Agave* es particularmente abundante con 58 especies, distribuidas en zonas semiáridas, ambientes secos, con fluctuaciones de temperatura y niveles altos de radiación solar, generalmente en tipos de vegetación como Pinus-Quercus, matorral xerófilo y bosque tropical caducifolio (Martínez-Antonio *et al.*, 2003; García-Mendoza, 2004; García-Mendoza, 2007). La mayoría de las especies crecen desde el nivel del mar hasta 3400 metros de altitud, siendo más común a intervalos altitudinales de 1000 a 2000 m sobre el nivel del mar (García-Mendoza, 2004; García-Mendoza, 2007).

El estado de Oaxaca cuenta con 12 especies endémicas, distribuidas en áreas menores de 30,000 km², son particularmente ricas en especies la provincia fisiográfica de la Mixteca, en especial el distrito de Huajuapán, también lo son la Depresión del Balsas y el Istmo de Tehuantepec (García-Mendoza, 2004). Las agaváceas endémicas se dividen, de acuerdo al tipo de vegetación y altitudes del medio, en tres grupos. En el primer grupo se encuentra el *Agave guiengola*, *A. nizardensis* y *Yucca* sp. nov, cuya distribución se restringe al Istmo de Tehuantepec entre 100 y 900m. El segundo grupo está conformado por *Agave covallis*, *Agave lurida*, *Yucca mixteca* y *Manfreda*, cuya distribución abarca las regiones de los Valles Centrales y la Mixteca, entre 1800 y 2200 m. En el tercer grupo se encuentran las especies *Agave atrovirens* var. *Atrovirens*, *Furcraea longae*, *Polianthes bicolor* y *Polianthes* sp. nov, cuya distribución abarca las regiones de la Mixteca Alta, Sierra Madre del Sur y Sierra Madre de Oaxaca, entre 2200 y 3000 metros. La especie *Agave americana* var. *Oaxacensis* se obtiene sólo bajo cultivo, se encuentra en diversos lugares de Valles Centrales (Martínez-Antonio *et al.*, 2003; García-Mendoza, 2004;).

3.1.1. *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum*

Reino: Vegetal

División: Angiosperma

Clase: Angiosperma

Subclase: Monocotiledonea

Orden: Amarilidaceae

Suborden: Iridales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *nussaviorum*



Figura 1. *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum*.

Agave nussaviorum (**Figura 1**) es una especie perteneciente al complejo taxonómico *Agave potatorum*, a su vez del grupo *Hemiflorae* descrita en el año 2010 por García-Mendoza. Es una planta perenne, solitaria, con rosetas abiertas a compactas, de 30 a 50 cm de alto y de 40 a 60 cm de diámetro. Hojas de 25 a 40 por planta, lanceoladas, oblongas a ovadas, algo cóncavas hacia la parte media y ápice, succulentas, flexibles, verde amarillentas, con espinas de 2 a 4 cm, florece de agosto a diciembre y fructifica de noviembre a marzo (García-Mendoza, 2010). Su distribución se restringe a la mixteca alta en los distritos de Coixtlahuaca, Huajuapán, Teposcolula, Nochixtlán, Juxtlahuaca y Tlaxiaco en altitudes de 1700 a 2500 m (**Figura 2**). Forma parte del bosque de pino-encino (*Quercus-Pinus*), enebro (*Juniperus*) y matorral esclerófilo (García-Mendoza, 2010).

Agave nussaviorum se nombra comunmente papalometl, papalomé, “yavi ticushi” o “yavi ndicunchi” (maguey pequeño y picudo). Los pobladores de las localidades cercanas a la presencia de *A. nussaviorum* lo usan principalmente como materia prima para la elaboración de mezcal, sin embargo, al ser una especie silvestre, la producción no es continua a lo largo del año pues depende de la disponibilidad de ésta; el qurote (tallo de la inflorescencia) es utilizado como instrumento musical de viento, las hojas y las flores son fuente de alimento en forma de dulces, guisos, tortillas; la piña y la base de las hojas son utilizadas para preparar una golosina agri dulce llamada “yahui ndodo” o “yavi tindusa”, cataplasmas y el jugo de las hojas son utilizados para el tratamiento de enfermedades del sistema circulatorio como coágulos sanguíneos, hemorroides, hematomas, inflamación de várices, inflamaciones por golpes, tratamiento de la artritis, tumores e infecciones, tratamiento de la diabetes y en el tratamiento de la onicomycosis.

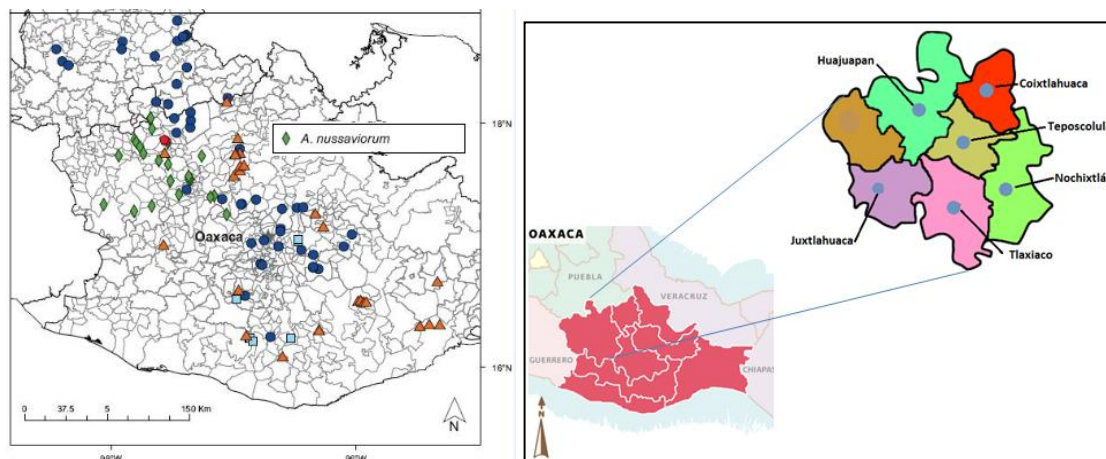


Figura 2. Distribución de *Agave nussaviorum* en el estado de Oaxaca y en distritos de la Mixteca Alta (Fuente: García-Mendoza, 2010)

Testimonios de pobladores refieren notables mejorías en diversas patologías como golpes, hematomas, derrames en los ojos, hemorroides, várices, hongos de los pies y diabetes. La vía de administración es oral, se muelen 2 pencas del maguey en 1/3 de vaso y se deja serenar toda la noche, se toma en ayunas, lo más alejado de los alimentos, pues es demasiado urticante y podría provocar vómito. Se toma la maceración por 3 días seguidos y se suspende su uso un mes, para después reiniciar el tratamiento. Para el tratamiento de la onicomycosis se sugiere que la duración del tratamiento sea de 6 a 8 meses, por 3 días consecutivos. Para el tratamiento de golpes la vía de administración puede ser oral o cutánea, con el uso de cataplasmas. Para el tratamiento de la diabetes, se consume el alimento agridulce “yahui-ndodo”, que consiste en una cocción de algunas partes del agave con trébol.

3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDOS POR ENERGÍAS ALTERNAS

3.2.1. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (UAE)

En la extracción asistida por ultrasonido los buenos resultados se deben a los efectos mecánicos como turbulencias y colisiones de la cavitación acústica, generada por ondas ultrasónicas intensas y el consecuente rompimiento de las paredes celulares por la implosión de burbujas que a su vez, disminuyen el tamaño de partícula y mejoran la transferencia de masa, solventes, la difusión de remolinos y la difusión interna en la materia vegetal, generalmente este fenómeno puede ser claramente observado por escaneo de la materia vegetal por micrografías electrónicas (**Figura 3**) (Vinatoru, 2001; Vilkhue *et al.*, 2008; Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2011). La extracción por ultrasonido brinda una mejor calidad de los extractos pues puede llevarse a cabo a bajas temperaturas, evitando con esto la degradación de compuestos termolábiles o la pérdida de compuestos volátiles por evaporación (Yang *et al.*, 2007; Picó, 2013).

La efectividad de la cavitación depende de las características del ultrasonido como la frecuencia (30-70 KHz) las propiedades de la materia vegetal (viscosidad y tensión superficial) y las condiciones del entorno (temperatura y presión). Es necesario un medio líquido para llevar a cabo la sonicación, una fuente generadora de energía y un transductor que convertirá la energía eléctrica, magnética o cinética a acústica (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2011). El método UAE puede llevarse a cabo por dos formas diferentes, directamente en la muestra (por sondas ultrasónicas) o indirectamente (a través de las paredes de un recipiente en un baño con agua) que generalmente resulta más redituable económicamente, sin embargo en la sonicación directa se obtienen potencias que superan en 100 a la energía ultrasónica suministrada en un baño (Picó, 2013).

En los métodos de UAE, algunos autores han indicado que cuando los compuestos deseados se encuentran en las glándulas superficiales del material vegetal, se puede inducir la liberación de compuestos por ondas ultrasónicas relativamente suaves, sin embargo, cuando los compuestos de interés se encuentran en las partes internas del material, es necesario realizar un pre tratamiento como el secado y reducción de tamaño, pues de esta manera se obtiene una extracción rápida y completa debido a la exposición mayor de células al solvente y a la cavitación ultrasónica (Vinatoru, 2001; Vilkhue *et al.*, 2008).

Entre las variables que afectan la eficiencia de la extracción asistida con ultrasonido se encuentran la potencia ultrasónica, pues al aumentar la potencia de las ondas ultrasónicas, la disrupción de los tejidos vegetales es mayor, por lo tanto, mientras la potencia del ultrasonido sea mayor, el solvente tendrá mejor posibilidad de penetrar los tejidos vegetales (Zou *et al.*, 2010). No obstante, una potencia de ultrasonido muy alta combinada con un largo tiempo de extracción podría disminuir drásticamente el rendimiento de fitocomponentes por degradación de compuestos (DaPorto *et al.*, 2013). El solvente de extracción es también una variable cuya importancia influye en la eficiencia de extracción, por ejemplo la capacidad de extracción aumenta al agregar agua al etanol, aumentando con ello la permeabilidad de los tejidos de la materia vegetal, permitiendo una mejor transferencia de masa por difusión (Yang *et al.*, 2013), así también con la presencia de agua la intensidad de la cavitación ultrasónica en el sistema etanol-agua se incrementa con la tensión superficial, y la viscosidad y la presión de vapor disminuye (Rostagno *et al.*, 2003). La aplicación de los ultrasonidos en los métodos de extracción mejora los rendimientos con el uso de etanol específicamente, comparable con el uso de butanona y acetato de etilo, por ello se puede contemplar la idea de no depender del uso de solventes tóxicos y costosos, y favorecer el uso de solventes económicamente más redituables y con grandes beneficios hacia la salud y el medio ambiente (Vilkhu *et al.*, 2008).

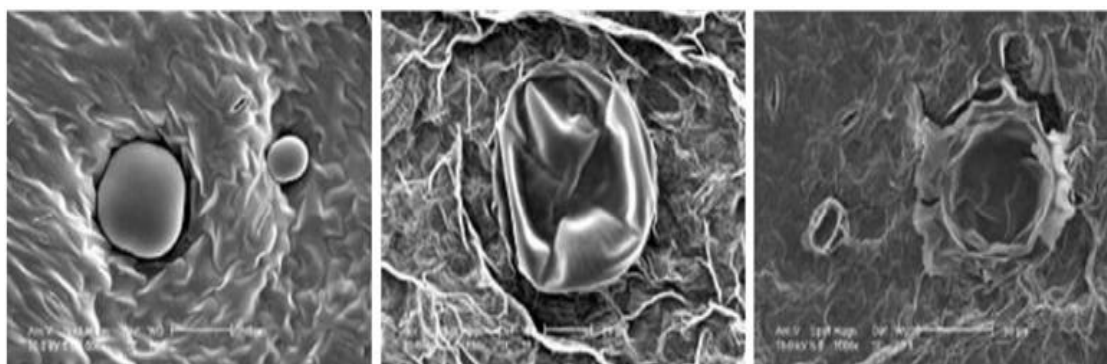


Figura 3. Efecto de la cavitación por ultrasonido en células de albahaca (Picó, 2013).

3.2.2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

Las microondas son ondas electromagnéticas que generalmente se encuentran a frecuencias de 300 MHz a 300 GHz y que pueden encontrarse como campos eléctricos y campos magnéticos, estos últimos son los responsables de la absorción de las ondas electromagnéticas y la consecuente transformación en calor. La extracción asistida por microondas es considerada una de las tecnologías más amigables con el ambiente y así también ha mostrado ser una de las técnicas de extracción con grandes ventajas pues reduce tiempos de extracción y cantidades de solvente, altas tasas de extracción a bajo costo, así como de la calidad de los compuestos obtenidos (Delazar *et al.*, 2012).

El fundamento del método MAE se centra en la extracción que se produce como resultado de los cambios en la estructura celular causada por las ondas electromagnéticas, donde se presentan 2 importantes fenómenos de transporte como el de calor y de masa (Veggi *et al.*, 2013). La eficiencia del calentamiento por microondas dependerá del factor de disipación del material, es decir, la habilidad de absorber las microondas y disipar el calor a las moléculas vecinas (Jain *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2011). El tamaño de partícula de la materia vegetal tiene un efecto significativo en la extracción asistida por microondas (MAE), pues mientras el tamaño de partícula sea menor más grande es la superficie de contacto con el solvente y se permite una mejor penetración de las microondas (Delazar *et al.*, 2012)

La respuesta de la importancia en la selección de solventes se centra en la idea de que los solventes altamente polares previenen la extracción de impurezas no polares, y así también, que los solventes con altas constantes dieléctricas pueden absorber de manera más eficaz la energía por microondas, por lo tanto, calientan de manera más eficiente la matriz de la muestra (Li *et al.*, 2009; Veggi *et al.*, 2013). Es importante indicar que la temperatura aumenta con el aumento de potencia del microondas, lo cual resulta conveniente pues a una mayor temperatura de extracción el tiempo de procesamiento se reduce, no obstante, temperaturas muy altas pueden destruir los componentes sensibles en el extracto (Teng *et al.*, 2009). La elección del solvente deberá considerar su buena solubilidad con el compuesto a extraer, su interacción con la materia vegetal y sus propiedades para la absorción de microondas (si así fuere el caso para MAE), es decir la constante dieléctrica que presente, pues una mayor constante facilita que el solvente penetre en la materia y facilite el calentamiento de ésta (Chan *et al.*, 2011). En general, el etanol es el solvente más utilizado por ser un

buen absorbedor de microondas y el más adecuado para la extracción de gran variedad de fitoquímicos (Zhou & Liu, 2006), no obstante es importante saber que un solvente que presenta buenos resultados en extracciones asistidas por microondas, puede no serlo para las extracciones convencionales (Chan *et al.*, 2011).

3.2.3. TRATAMIENTOS PREVIOS A LA EXTRACCIÓN

El método de extracción representa la fase más importante en la obtención de los fitoquímicos, pues de ésta fase depende el éxito en los resultados, no obstante, resulta de gran importancia el pre-tratamiento al que se somete el material vegetal, pues se mejoran las condiciones que anteceden a la extracción y se obtiene una mayor eficiencia (Majinda, 2012). La aplicación de un pre-tratamiento en la extracción asistida por ultrasonido y microondas reduce tiempos de extracción de compuestos herbales (Vilkhu *et al.*, 2008)

a) Reducción de tamaño

El material vegetal, ya sean raíces, hojas, flores, frutos, etc, son generalmente sometidos a secado por aire, y posteriormente a una reducción de tamaño hasta la obtención de polvos. Este paso favorece el rendimiento de la extracción, mientras las partículas del material vegetal tienen un menor tamaño, la superficie de contacto con los solventes es mayor y *por ende* la extracción de los fitoquímicos de interés también aumenta. El principio que sigue este factor es que un menor tamaño de partícula favorece la eficiencia de la transferencia de masa en el proceso (Majinda, 2012). Algunas cuestiones clave han sido estudiadas y documentadas, v.gr : la naturaleza de los tejidos a extraer y la localización de los compuestos activos deseados con respecto a las estructuras en las especies vegetales, el pre-tratamiento de la materia antes de llevar a cabo la extracción, la naturaleza de los componentes extraídos, los efectos del ultrasonido en la disrupción del tejido superficial, el incremento de la superficie de transferencia de masa, el incremento del rendimiento de extracción, entre otras (Caili *et al.*, 2006).

b) Solvente de extracción

Una parte medular en el proceso es la elección del solvente, pues de ésta dependerá el éxito de la extracción. Usualmente se consideran solventes altamente polares como el agua, etanol, metanol, butanol; mezclas de etanol: agua, metanol: agua (Guerra et

al., 2008). Sin embargo, algunos solventes como el metanol, dan como resultado la formación de metil derivados que originalmente no se encuentran en la planta (Majinda, 2012), por ello, las extracciones realizadas con soluciones de etanol-agua ofrecen mejores resultados, pues las extracciones con calor pueden desnaturalizar los compuestos de interés (Sahu *et al.*, 2008). Algunos puntos que deben considerarse en la elección del solvente son: la selectividad hacia el fitoquímico de interés, la compatibilidad con los análisis cromatográficos posteriores, la capacidad de absorción de microondas para asegurar el calentamiento rápido y el volumen suficiente para cubrir completamente la materia vegetal (Chan, Yusoff, Ngoh, & Kung, 2011).

c) Relación solvente:sólido

La relación del solvente:sólido es un parámetro importante que debe optimizarse. La importancia de este factor radica en que la cantidad de solvente deberá ser la suficiente para que la materia vegetal se encuentre completamente inmersa en él, y que la irradiación de microondas, ultrasonidos o la transferencia de calor se difunda en todo el sistema. En las extracciones convencionales, una mayor cantidad de solvente aumenta la eficiencia de extracción, no obstante, demasiado solvente podría acarrear algunos problemas como un mal calentamiento debido a que una baja proporción de solvente representa una barrera para la transferencia de masa limitando el movimiento de los fitoquímicos de interés, por ello sería necesario más tiempo y energía para condensar el solvente de extracción, provocando con ello una barrera en la transferencia de masa (Li *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2011).

d) Tiempo de extracción

El tiempo de extracción es un factor importante a considerar. Generalmente en la extracción asistida por microondas, el tiempo consta de minutos, evitando con esto la degradación y oxidación de compuestos, situación que es de gran interés debido a la sensibilidad térmica de los metabolitos secundarios. El tiempo de irradiación puede estar influenciado por las propiedades dieléctricas del solvente; solventes como agua, etanol, metanol pueden calentarse demasiado en un tiempo de extracción más largo, poniendo en riesgo el futuro de los componentes termolábiles (Mandal *et al.*, 2007)

e) Potencia y temperatura de extracción

La temperatura y potencia de extracción son factores que van de la mano en los métodos UAE y MAE pues una mayor potencia puede aumentar la temperatura de extracción provocando una disminución de la tensión superficial y la viscosidad del solvente, no obstante, una potencia muy alta de la emisión de microondas podría disminuir los rendimientos de extracción por la desnaturalización de compuestos termosensibles (Veggi *et al.*, 2013). La elección de la temperatura de extracción depende de la estabilidad y el rendimiento de la extracción del compuesto activo deseado (Chan *et al.*, 2011). El efecto de la temperatura en la extracción se debe a que al incrementar la temperatura las antraquinonas son más solubles, la viscosidad y la densidad disminuye y se favorece la transferencia de masa; así también, por la disminución de la viscosidad del solvente, las burbujas originadas por la cavitación ultrasónica se produjeron con mayor facilidad (Hemwimol, Pavasant, & Shotipruk, 2006).

Las extracciones realizadas con soluciones de etanol-agua y en frío dan mejores resultados, pues las extracciones con calor pueden desnaturalizar los compuestos de interés (Sahu *et al.*, 2008), sin embargo mientras la temperatura es mayor, el rendimiento en la extracción también podría ser mayor, debido a la difusión de los compuestos de interés, contrario a ello, anteriores investigaciones habían demostrado que mientras la temperatura en la extracción por ultrasonido se acerca al punto de ebullición de la mezcla, el efecto de la sonicación se vuelve ineficaz como resultado de la disminución de la tensión superficial y el incremento en la presión de vapor con las microburbujas, que a su vez causan la amortiguación de las ondas ultrasónicas (Zhao *et al.*, 2006).

3.3. INFECCIONES MICÓTICAS

Las dermatofitosis también denominadas tineas, son enfermedades infecciosas del estrato córneo de tejidos queratinizados como la piel, el pelo y las uñas, provocados por dermatofitos, es decir, un grupo de hongos queratinofílicos principalmente de los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton* (Arango & Castañeda, 2003; Vilata, 2005). Las lesiones que caracterizan a las dermatofitosis son el resultado de la colonización de las capas superficiales por el hongo y la liberación de sus productos metabólicos, así como la respuesta inflamatoria del hospedero. Las dermatofitosis

afectan a todas las edades, por lo general son crónicas y poco inflamatorias, con mayor frecuencia en pacientes varones (60%) entre la tercera a sexta décadas de la vida, y con presencia en niños escolares en un 4 a 8%, así también existen factores que predisponen al padecimiento de dermatofitosis como la diabetes, pacientes inmunodeprimidos, pacientes infectados con VIH y pacientes de la tercera edad (Arenas, 2002; Velez *et al.*, 2003; Vilata, 2005; Arrese *et al.*, 2006). La tiña de la cabeza se observa en niños (98% de los casos) y ocasionalmente en mujeres adultas; predomina en personas de nivel socioeconómico bajo (Magaña, 2003), la tiña del cuerpo aparece a cualquier edad y en ambos sexos, constituye del 15 al 25% de los casos de dermatofitosis, las tiñas de la ingle y los pies predominan en varones adultos, y constituyen 17 y 20 a 51%, respectivamente, las onicomycosis se observan con mayor frecuencia en pacientes varones adultos, son más frecuentes en pacientes a partir de los 20 años, alcanzando los máximos valores entre los 40 y 50 años (Arrese *et al.*, 2005). La tiña de las uñas se presenta en un 30% de las dermatofitosis y en el 85-87% de las onicomycosis, la relación varón:mujer es de 1,5:1 (Arenas, 2002). La incidencia en pacientes con SIDA varía de un 15 al 40%. Los agentes causales más importantes son *Trichophyton rubrum* (36 a 52% y hasta 80%), *Microsporum canis* (14 a 24%), *Trichophyton tonsurans* (15 a 18%), *Trichophyton mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum* (3 a 8%) (Wolff *et al.*, 2002).

Las dermatofitosis son micosis superficiales comunes en México y tienen una frecuencia de 5% en la consulta dermatológica (Arenas, 2002). En Guadalajara en un estudio retrospectivo en 5578 pacientes, las dermatofitosis ocuparon el 79% y representaron el 4% de la consulta dermatológica. La tiña de los pies fue la más frecuente con un 36%, y el agente etiológico fue *Trichophyton rubrum* con 57%, siguieron *Microsporum canis* en 20%, *Trichophyton mentagrophytes* 10%, *Trichophyton tonsurans* 9%, *Epidermophyton floccosum* 2%, y con menos del 1% *Trichophyton violaceum*, *Microsporum gypseum* y *Microsporum audouinii* (Arenas, 2002).

La infección puede ser adquirida por contacto con animales o personas enfermas, lo que implica una exposición a la fuente de contagio, predisposición genética, y factores propicios como la humedad, calor, diabetes, uso prolongado de glucocorticoides, calzado cerrado, mala higiene, mala costumbre de no secarse correctamente los pies, en el cabello puede observarse una relación con los hábitos de peinado así como en el uso de aceites o fijadores (Wolff *et al.*, 2002). La onicomycosis representa un problema

estético, sin embargo es también un reservorio de hongos patógenos, y en pacientes inmunodeprimidos representa una posible diseminación y un peligro a la vida (Arrese *et al.*, 1996).

Trichophyton rubrum es el principal causante de la onicomycosis, para combatirlo se han utilizado fármacos sintéticos de eficacia variable. Por vía oral son comúnmente utilizados el fluconazol, minisatrina, nistatina, itraconazol, terbinafina, griseofulvina, algunos de los efectos secundarios incluyen daño a nivel renal y hepático, intolerancia medicamentosa como erupciones cutáneas, prurito, náuseas o vómitos, dolor abdominal, dolores de cabeza, mareos, fatiga, reducción de la presión arterial, shock o anafilaxia, depresión, pérdida del cabello, sensaciones de hormigueo (Nizoral, 2008; Suarez-Lasso, 2010). La terapia tópica constituiría el tratamiento ideal, ya que no produce efectos adversos sistémicos ni interacciona con otros posibles fármacos que reciba el paciente, pero el tratamiento es largo y sólo consigue la curación en algunos grupos de onicomycosis. Por ello, en el resto de casos se precisa la administración de antifúngicos sistémicos. El más utilizado clásicamente en el tratamiento de las onicomycosis es el ketoconazol, cuyo tratamiento tiene una duración de 3 meses. Estos se han sustituido por nuevos principios activos que consiguen relativamente mejores resultados con menor duración de tratamiento y mejor perfil de seguridad, como el itraconazol, un derivado azólico cuyo tratamiento dura de seis a nueve meses (Vilata, 2005; Magaña, 2003; Wolff *et al.*, 2002).

3.3.1. COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Los compuestos fenólicos constituyen la mayor clase de metabolitos secundarios distribuidos en el Reino Vegetal (Santos-Buelga *et al.*, 2012).

Las plantas contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, ácidos fenólicos y sus derivados, isoflavonas, lignanos) comúnmente llamados polifenoles, que son responsables de algunas de las propiedades medicinales y principalmente de la capacidad antioxidante (Dimitrov *et al.*, 2010).

Los flavonoides son compuestos en forma de glucósidos de diversos azúcares, cuya aglicona es un derivado de la fenilbenzopirazona. La unión glucosídica de la aglicona y el azúcar suele estar sobre grupos fenólicos en las posiciones 3 o 7. Existen 4 tipos de flavonoides, que derivan de los siguientes cuatro núcleos: flavona, flavanona, flavonol e isoflavona (**Figura 4**) (Primo, 2007).

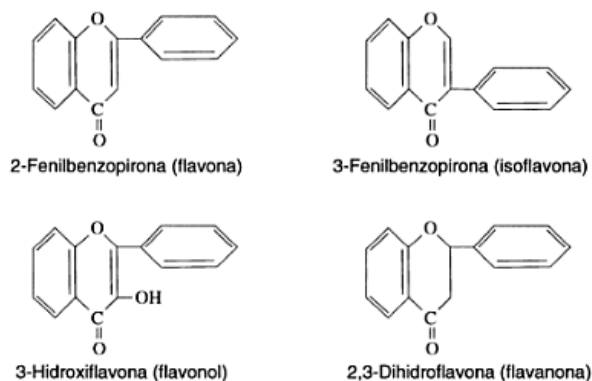


Figura 4. Diferentes núcleos de flavonoides

Los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante que está fuertemente ligada a la capacidad de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. La presencia de grupos hidroxi-fenólicos, con propiedades de quelación de hierro y otros metales de transición *in vitro* e *in vivo* (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

Los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos para la actividad antifúngica y antimicrobiana contemplan desde su incursión en la síntesis de ADN y ARN hasta la modificación del citoplasma de los microorganismos. En un estudio usando precursores radioactivos, se mostró que la síntesis de ADN fue fuertemente inhibida por flavonoides en *Proteus vulgaris*, mientras que la síntesis de ARN fue la más afectada en *Staphylococcus aureus*. Algunos flavonoides que exhiben este mecanismo de acción son la robinetina, la mirircetina y la epigallocatequina. Las proteínas y lípidos también son afectados. Los autores sugieren que el anillo B de los flavonoides es importante en la intercalación de los enlaces de hidrógeno con las bases del ácido nucleico, que podría explicar la inhibición de la síntesis de ADN y ARN (Mori *et al.*, 1987). Así también se ha demostrado que algunos flavonoides como la quercetina, provocan un incremento en la permeabilidad de la membrana de los microorganismos y una disipación potencial de la membrana (Mirzoeva *et al.*, 1997).

Los hongos y levaduras son organismos eucariontes, por ello, muchas características estructurales distan de las bacterias, puesto que la pared celular es rígida y formada por quitina o polisacáridos complejos (Sánchez-Carazo *et al.*, 1999). La membrana citoplasmática compuesta en 90% por polisacáridos y en 10% a 20% por lípidos y glicoproteínas, protege al hongo de la lisis osmótica pues regula la entrada y salida de

metabolitos, y generalmente, es el punto de acción de los antimicóticos. El ergosterol es el principal componente lipídico de la membrana de los hongos sobre el cual actúan la mayoría de los fármacos antimicóticos. La síntesis del ergosterol, cuyo precursor es el escualeno, está compuesta por una serie de etapas que son objetivo de los medicamentos antifúngicos (Pitt & Hocking, 2009). La actividad antifúngica contra levaduras del género *Candida* ha sido producto del incremento de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ERO) induciendo la apoptosis de las células debido a los daños causados en el ADN, oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y de aminoácidos en las proteínas (Ansari *et al.*, 2013). En la especie *Cryptococcus neoformans*, el modo de acción de los compuestos fenólicos se atribuye al daño o disrupción de las membranas celulares, así como la inhibición del proceso de biosíntesis del ergosterol (Guo *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2012).

Entre otros mecanismos de acción se pueden mencionar la disrupción de la fluidez de las membranas por interacción con el ergosterol, la inhibición del crecimiento micelial así como la acción en el tigmotropismo y dimorfismo (Verástegui, 2000; Ansari *et al.*, 2013).

3.3.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son químicamente similares a algunos otros compuestos (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianinas, cumarinas, entre otros) por lo que la obtención de material puro puede resultar complicado.

Diversas fases estacionarias son usadas en columna cromatográfica usando diferentes mecanismos de separación (adsorción, exclusión por tamaño, intercambio iónico, etc), entre las que destacan la sílica gel en fase normal y reversa, Sephadex LH-20 ® y la poliamida (Grotewold, 2007; Khoddami *et al.*, 2013). Generalmente, la purificación de compuestos fenólicos está basada en la cromatografía por adsorción, donde se establecen enlaces de hidrógeno entre los donantes de protones fenólicos y los grupos aceptores de la resina, así como por las interacciones hidrofóbicas con los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos. Por ello, la afinidad hacia la fase estacionaria aumenta con el número de grupos de hidroxilos fenólicos y anillos aromáticos. Sin embargo, una de las desventajas de llevar a cabo la cromatografía por adsorción en la purificación de compuestos fenólicos es el hecho de que las resinas tienen un alto grado de adsorción o alto rendimiento de elución, por lo que el fraccionamiento podría

ser poco selectivo en el aislamiento (Santos-Buelga *et al.*, 2012). Amberlite ® XAD-2, es un excelente un adsorbente polimérico hidrofóbico no iónico ampliamente usado en la separación de flavonoides y ácidos fenólicos por su selectividad (Rosler & Goodwin, 1984). Sephadex LH-20 es comunmente usada para la separación de flavan-3-oles, debido al mecanismo de la exclusión por tamaño y adsorción, usando eluciones de alcohol acuoso y acetona acuosa (González, 2006).

La selección de las fases móviles requiere la aplicación de gradientes de mayor polaridad (fase normal) o de solventes mayormente hidrofóbicos (fase reversa). La elección de la fase móvil depende de la naturaleza del compuesto a extraer, por ejemplo, los aglicones de los flavonoles y flavonas generalmente son menos polares cuando están metilados o acilados y requieren disolventes menos polares para su extracción, tales como éter, hexano y diclorometano. Los disolventes de elección son combinaciones de agua con metanol, etanol o acetona y algunos ácidos (González, 2006). La **Tabla 5** concentra algunos trabajos en los cuales se observan algunos sistemas de solventes mayormente usados en la extracción de compuestos fenólicos.

Por otra parte, para la visualización de los flavonoides y glicósidos de flavonas en CCF se usa generalmente el reactivo NP/PEG, que consiste en una mezcla de difenilboriloxietilamina (NP) y polietilenglicol etanólico 4000 (PEG), que asperjada a 366 nm en luz UV, presenta una intensa fluorescencia que emite un color que vá desde el anaranjado, amarillo verdoso y verde oscuro, dependiendo de la estructura del flavonoide; o a 254 nm en luz UV donde es posible observar la fluorescencia de todos los flavonoides (Wagner & Bladt, 1995).

Tabla 5. Fase estacionaria y móvil usadas en la purificación de compuestos fenólicos

REFERENCIA	ESPECIE	METABOLITO SECUNDARIO	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL
Kammerer <i>et al.</i> , 2005	<i>Vitis vinifera L</i>	Antocianinas	Amberlite XAD 16HP	MetOH
Murthy <i>et al.</i> , 2012	<i>Coffea arabica</i>	Antocianinas	Sephadex LH-20	MetOH/ H ₂ O /ATC (20:79.5:0.5)
Acharya <i>et al.</i> , 2013	<i>Camelia sinensis</i>	Catequinas	Sephadex LH-20	MetOH- H ₂ O (1:1)
Hirobe <i>et al.</i> , 1997	<i>Vitex agnus-castus</i>	Flavonoides	Sephadex LH-20	CHCl ₃ -MeOH (1:1) y CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (8:9:1-6.7:3:0.3)
Candido, 2014	<i>Myrciaria floribunda</i>	Flavonoides	1.Amberlite XAD 2.Sephadex LH-20	1. MetOH:H ₂ O (1:1), MetOH, ACN 2. MetOH, MetOH-H ₂ O

4. HIPÓTESIS

H1: Los extractos de *Agave nussaviorum* inhiben el crecimiento de hongos causantes de dermatofitosis.

H2: El estudio fitoquímico de los extractos de *Agave nussaviorum* permitirán conocer la composición y la actividad biológica de los compuestos presentes.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición química y actividad antifúngica in vitro de extractos de *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum*.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener extractos de *Agave nussaviorum* mediante métodos de extracción basados en el uso de energías alternas (microondas y ultrasonido).
- 2) Evaluar la actividad antifúngica de extractos de *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum*.
- 3) Realizar el estudio fitoquímico de los extractos de *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum*.

6. METODOLOGÍA

6.1. MATERIAL VEGETAL

Hojas de *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum* fueron colectadas al amanecer en la localidad de San Pedro y San Pablo Teposcolula, perteneciente al Distrito de Teposcolula, en la región Mixteca de Oaxaca, México, en abril del 2013.

6.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

El material vegetal fue cortado en tiras de aproximadamente 10 cm de largo por 1 cm de ancho, que se llevaron a sequedad en estufa a 45°C por 6 días, en ausencia de luz. Las hojas secas fueron molidas por un molino con tornillo sin fin hasta su pulverización con un tamaño de partícula aproximado de 0.25 mm y fueron sometidas a un proceso de extracción por Soxhlet con n-hexano por 3 horas.

En la extracción asistida por microondas se utilizó una unidad de refrigeración acoplada a un horno de microondas modificado Samsung MW630WA, salida de frecuencia de 2450 MHz y potencia de 850 W. Para llevar a cabo el método de extracción asistida por ultrasonido se usó un baño ultrasónico (Cole-Parmer, Modelo 08890-21) con 70 W de potencia y 42 KHz de frecuencia.

Se evaluaron distintos parámetros en ambos métodos para la selección de las condiciones del proceso, 5 g de material vegetal fueron sometidos en cada corrida experimental donde 3 factores fueron evaluados: concentración de solvente, tiempo de extracción y relación solvente/sólido. La **Tabla 6** concentra los factores a evaluar en el método UAE y la **Tabla 7** para el caso de la extracción por MAE.

Los extractos de *Agave nussaviorum* fueron obtenidos siguiendo el diagrama representado en la **Figura 5**. El rendimiento fue llevado a cabo siguiendo el método de Makkar *et al.*, 2007, basado en la reacción con anisaldehído y etil acetato en un medio ácido para la generación de un complejo colorimétrico cuya absorbancia puede ser medida a 430 nm.

Un análisis factorial completo 3x3x3 fue aplicado para determinar las mejores condiciones de operación. Cada evaluación fue realizada por triplicado.

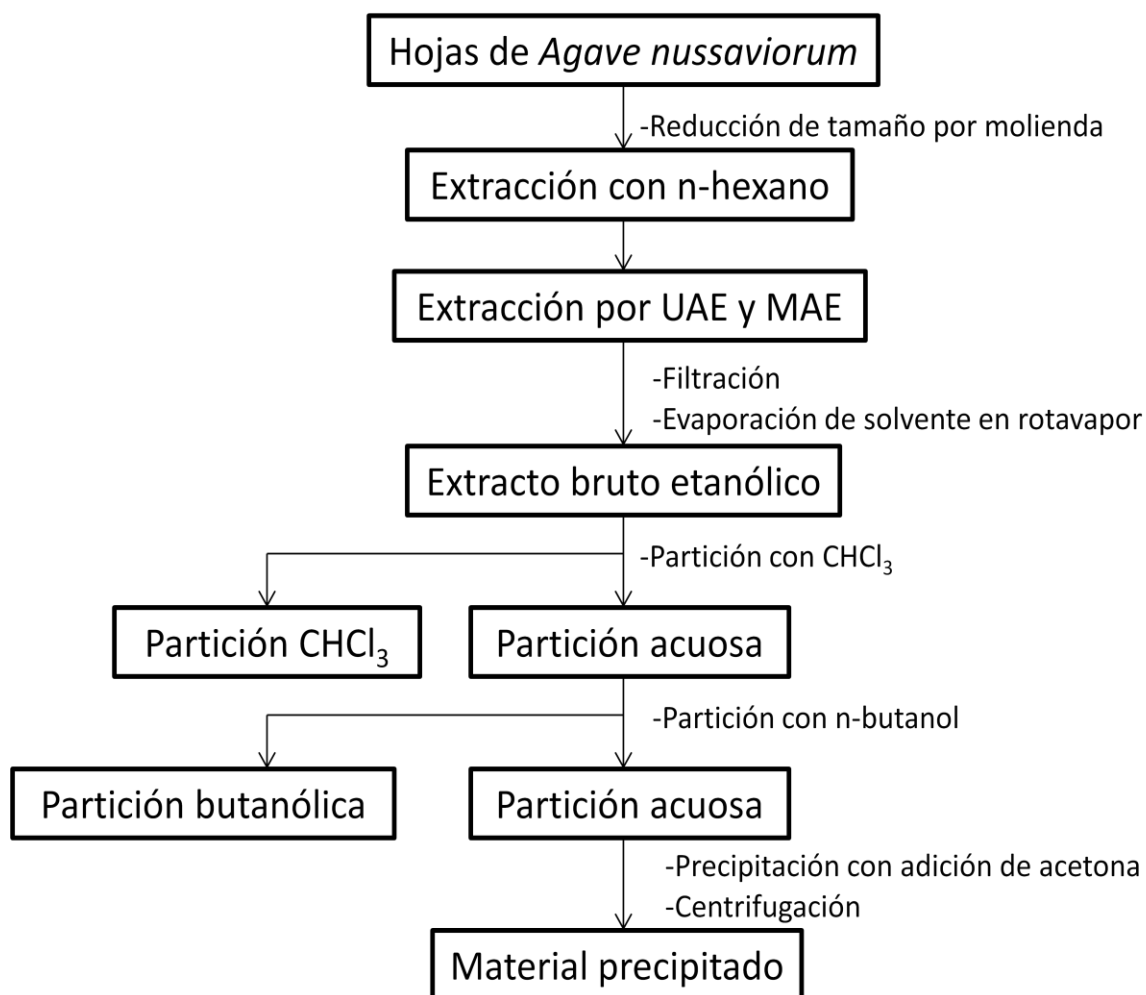


Figura 5. Diagrama de obtención de extractos de *Agave nussaviorum*.

Tabla 6. Variables independientes y su nivel correspondiente en el método UAE

Variable independiente	Nivel		
	1	2	3
Concentración de etanol (%)	0%	50%	70%
Tiempo de extracción (min)	10	60	120
Relación solvente:sólido (mL/g)	10:1	30:1	50:1

Tabla 7. Variables independientes y su nivel correspondiente en el método MAE

Variable Independiente	Nivel		
	1	2	3
Concentración de etanol (%)	45	70	95
Tiempo de extracción (min)	1	16	31
Relación solvente:sólido (mL/g)	5:1	20:1	35:1

6.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIBACTERIANA

6.3.1. MICROORGANISMOS

Las siguientes cepas fueron utilizadas en este estudio: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida parapsilosis* (CFQ-L-08), *Trichophyton rubrum* (CFQ-H-93), *Trichophyton mentagrophytes* (CFQ-H-92), obtenidas del cepario de la Facultad de Química de la UNAM y 9 aislados de pacientes con onicomycosis identificados por sus características macro y microscópicas como *T. mentagrophytes* (FM796) y *T. rubrum* (FM309, FM626, FM774, FM794, FM932, FM934, FM941, FM943) donadas por la Facultad de Medicina de la UNAM.

6.3.2. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD-HALO DE INHIBICIÓN

La actividad antifúngica cualitativa se evaluó usando el método M44-A modificado de difusión en disco del CLSI. Para ello se realizó la extensión en placa de suspensiones de todos los microorganismos ($1-4 \times 10^6$ UFC) en placas de agar Mueller-Hinton (para el crecimiento de bacterias) y agar papa dextrosa (para el crecimiento de hongos y levaduras). Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron impregnados con los extractos UAE y MAE a una concentración de 5 mg/mL, colocados en las placas de agar e incubados a 30°C por 24 horas para *S. aureus*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*, mientras que para los hongos filamentosos el tiempo de incubación fue de 5 días. La actividad antimicrobiana fue evaluada midiendo el diámetro del halo de inhibición, cada experimento fue llevado a cabo por duplicado.

6.3.3. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó siguiendo el método estandarizado del CLSI M27-A2 de microdilución para levaduras y el M38-A para hongos filamentosos, usando el medio de cultivo RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato de sodio, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (0.164 M) en microplacas de 96 pozos. Los extractos obtenidos por microondas y ultrasonido fueron diluidos serialmente en RPMI 1640 obteniendo concentraciones de 5 a 0.05 mg/mL. Los inóculos se prepararon a partir de suspensiones de 2 a 3 colonias de *C. parapsilosis*, *C. albicans* y *S. aureus* en solución salina estéril al 0.8%, mientras que los hongos filamentosos fueron cosechados a partir de cultivos sólidos en PDA de 7 días de crecimiento a 30°C. Los conidios se colectaron en solución salina con ayuda de perlas de vidrio y se filtraron para remover las hifas con un filtro de diámetro 7µm. A partir de las suspensiones se realizó el conteo en cámara de Neubauer y se ajustó el inóculo en medio RPMI de 2×10^4 a 3×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

Los pozos fueron inoculados con 100 µl de la suspensión de microorganismos, seguido de 100 µl de extractos obtenido por microondas y ultrasonido respectivamente, con un volumen final de 200 µl en cada pozo. Todas las concentraciones fueron evaluadas por triplicado para cada microorganismo. Las microplacas fueron incubadas a 30°C por 24 horas para las levaduras y *S. Aureus*, y 7 días para los hongos filamentosos. Después de la incubación las placas fueron leídas en un lector de microplacas (BioTek Modelo PowerWave XS2) a 790 nm (**Figura 6**). Se usó anfotericina B (64 µg/mL), gentamicina (16 µg/mL) y RPMI 1640 como controles negativo y positivo de crecimiento microbiano respectivamente.

La CMI se definió como la concentración más baja de extracto a la cual se inhibió el crecimiento después de la incubación. El crecimiento porcentual se calculó como la concentración que inhibe un 50% del crecimiento de la población de microorganismos (IC50). Además se determinó la concentración mínima fungicida (CMF) al resembrar en PDA 50 µl del medio de prueba de los pozos que no presentaron crecimiento microbiano visible y la CMF se definió como la concentración más baja a la cual no se observó crecimiento microbiano en la resiembra.

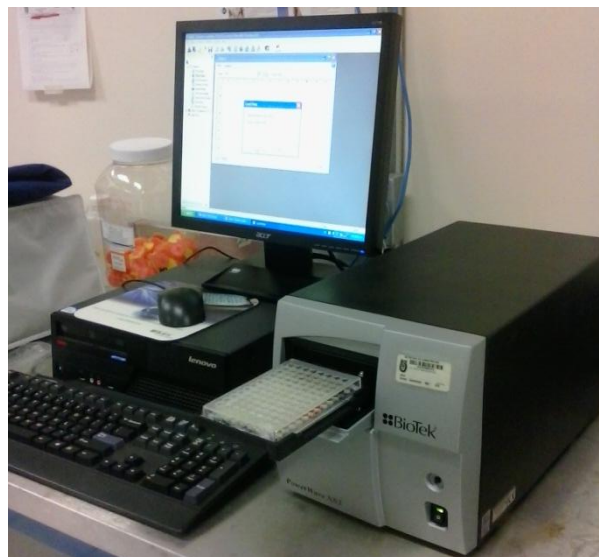


Figura 6. Lector de microplacas BioTek Modelo PowerWave XS2

6.4. MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

6.4.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

Los ensayos cromatográficos fueron realizados con Sílica 60 como fase normal en hojas de aluminio ALUGRAM® SIL G/UV254 20 x 20 con 0.20 mm de espesor como fase estacionaria. Para la fase móvil, fueron utilizados los siguientes solventes: cloroformo, ácido acético glacial, metanol, agua, acetato de etilo, ácido fórmico, hexano en diferentes gradientes de concentración. Todos los reactivos utilizados son de grado reactivo analítico, obtenidos del fabricante VETEC® (Rio de Janeiro, Brasil).

Los reveladores químicos utilizados fueron:

-Solución de orcinol: 6% solución de orcinol en etanol (Solución 1) y 0.1%FeCl₃ en HCl concentrado (Solución 2). Se adicionaron 3.5mL de la Solución 1 en la Solución 2, se asperjó y calentó a 110°C por 10 minutos.

-Solución de vainillina sulfúrica: 1% vainillina en etanol (Solución 1); 10% ácido sulfúrico en etanol (Solución 2). Se asperjaron 10 mL de la Solución 1 seguido de 10 mL de la Solución 2 y calentar a 110°C por 5 minutos sobre observación.

-Solución de anisaldehído sulfúrico: solución de 0.5 mL de p-anisaldehído, 98% (Sigma Aldrich Chemical Company, Inc, Milwaukee, USA) en 10 mL de ácido acético glacial, seguido de la adición de 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Wagner & Bladt, 1995)

-Reactivo NP/PEG/UV 254-365 nm (1% p/v NP metanólico, 5% p/v PEG metanólico solubilizado en ultrasonido) (Wagner & Bladt, 1995).

6.4.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Para llevar a cabo la purificación y el aislamiento de los extractos obtenidos por los dos métodos de extracción MAE y UAE de *Agave nussaviorum*, las particiones acuosas fueron resuspendidas en metanol, filtradas y sometida a fraccionamiento por exclusión molecular en una columna cromatográfica de vidrio conteniendo SEPHADEX™ LH-20 (GE-HEALTHCARE) como fase estacionaria y metanol como fase móvil.

6.4.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC-UV)

El análisis cromatográfico fue realizado siguiendo el siguiente método. 2 mg del material hidrolizado de la fracción 30-34 fueron solubilizados en 2 mL de MeOH. El material fue filtrado a través de una membrana de celulosa regenerada (0.45 µm). El perfil cromatográfico fue evaluado usando un cromatógrafo en fase líquida LC-A20 con un software LC Solution, equipado con una bomba LC-20AT, desgasificador DGU-20A3, detector UV/ Vis DAD-20A, horno CTO-20A, inyector SIL-20A, kit válvula LPGE e-Shimadzu (**Figura 7**), columna cromatográfica MACHEREY-NAGEL NUCLEODUR 100-5 C18 de acero inoxidable de 150/4, 5 µm (250 mm x 4mm). La fase móvil A fue preparada con 0.1% de ácido trifluoroacético en agua; fase móvil B de acetonitrilo. Fue utilizado un gradiente de elución utilizando la siguiente escala: 0 a 50 minutos la fase B llega a 50% y en 55 minutos la fase B llega a 100% hasta alcanzar 60 minutos. La tasa de flujo fue de 1 mL/ min con detección de UV en un intervalo de 200 a 450 nm. El mismo método fue realizado para el análisis de la quercetina como padrón. El tiempo total de análisis fue de 60 minutos. Finalmente la columna fue lavada con la fase móvil A por 10 minutos.



Figura 7. Equipo HPLC Shimadzu

6.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

6.5.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI-Q-TOF-MS)

Las fracciones purificadas de los extractos fueron sometidas a análisis directo en un detector de masas por ionización por electrospray con analizador cuádruplo por tiempo de vuelo (ESI-Q-TOF-MS) microOTOF por impacto de electrones (70 eV) en el Núcleo de Productos Naturales perteneciente a la Universidad Federal de Rio de Janeiro (NPPN-UFRJ). La muestra fue inyectada en un flujo de 180 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ y detectada en modo positivo $[\text{M}+\text{Na}]^+$. El rango de análisis fue utilizado entre 50 m/z y 1600 m/z y el espectro de masa fue analizado con ayuda del software Bruker Compass DataAnalysis 4.0. Las condiciones de la cromatografía en fase gaseosa fueron: temperatura de inyección, 260°C; temperatura FID, 290°C; helio como gas de arrastre, tasa de flujo de 1 mL/min e inyección Split con 01:40 de relación de Split. La temperatura de horno inicial fue de 60°C y la final de 290°C, con un aumento a una tasa de 3°C/min. 1 mg/mL de la muestra, disuelta en metanol (1:1 mg/mL), fue inyectada en la columna RTX-5 (id=0.25 mm, longitud 30 m, espesor= 0.25 mm). Las condiciones de la espectroscopía de masas (MS) fueron: voltaje de 70 eV y tasa de barrido de 1 scan/s.

6.5.2. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H Y ^{13}C

Las fracciones purificadas fueron sometidas a un análisis en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear en el Laboratorio Multiusuario de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Federal Fluminense (LAREMN-UFF), los espectros de RMN ^1H , ^{13}C , COSY y HSQC fueron obtenidos en el equipo Varian VNMRS (**Figura 8**) con frecuencia de 300 a 500 MHz ^1H y 125 MHz para ^{13}C , utilizando DMSO deuterado y TMS para la calibración de los espectros. Los desplazamientos químicos (δ) fueron expresados en partes por millón (ppm). La edición de los espectros fue realizada utilizando el programa MestReNova 6.0.2-5475 (MESTRELAB RESEARCHS.L., 2009).



Figura 8. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear
(Fuente: <http://www.uff.br/laremn/>)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

7.1.1. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MÉTODO UAE

Los efectos de las variables y los niveles correspondientes (**Tabla 8**) del análisis factorial 3x3x3 se presentan en la **Tabla 10**.

La **Tabla 9** muestra el ANOVA multifactorial realizado para el método UAE, donde se observa que las variables que mayor efecto significativo presentan son la concentración de etanol y la relación solvente:sólido. Puesto que P valor es menor que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de compuestos orgánicos con un 95.0% de nivel de confianza. La **Figura 9** presenta las condiciones a las cuales se obtuvo el mayor contenido de materia orgánica, siendo estas las siguientes: concentración de etanol al 70%, tiempo de extracción de 110 minutos y una relación solvente:sólido de 50:1, obteniendo un rendimiento de 5.38% con 269.48 mg/mL de compuestos bioactivos.

Tabla 8. Factores y niveles evaluados en la extracción UAE

Variable independiente	Nivel		
	1	2	3
Concentración de etanol (%)	0%	50%	70%
Tiempo de extracción (min)	10	60	120
Relación solvente:sólido (mL/g)	10:1	30:1	50:1

Tabla 9. Análisis de Varianza para la concentración de compuestos orgánicos en el método UAE

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Concentracion de etanol	36427.8	2	18213.9	47.45	0.0000
B:Tiempo	203.315	2	101.658	0.26	0.7683
C: Relacion solvente: sólido	17345.5	2	8672.77	22.59	0.0000
Interacciones					
AB	11709.4	4	2927.36	7.63	0.0001
AC	13714.2	4	3428.54	8.93	0.0000
BC	6493.61	4	1623.4	4.23	0.0047
ABC	48728.6	8	6091.08	15.87	0.0000

Tabla 10. Variables respuesta del diseño factorial 3x3x3 en la extracción UAE

Concentración de etanol	Tiempo	Relación solvente/sólido	Compuestos bioactivos	Desviación típica
1	1	1	101.8889	17.71909
		2	151.8889	3.48055
		3	198.7407	19.03606
	2	1	172.1667	14.63285
		2	181.6111	.55556
		3	155.6852	22.16021
	3	1	195.9630	12.39877
		2	113.0000	4.20354
		3	77.3519	26.73794
2	1	1	209.2037	33.33372
		2	161.5185	2.04753
		3	201.8889	46.10023
	2	1	167.7222	11.34477
		2	173.3704	7.45529
		3	178.3704	18.59521
	3	1	213.4630	7.80913
		2	181.7037	1.42544
		3	201.3333	20.83889
3	1	1	217.6296	37.52194
		2	177.7222	2.00308
		3	177.3519	11.12961
	2	1	244.6667	25.14311
		2	142.7222	4.16667
		3	214.4815	18.30455
	3	1	208.0000	27.84852
		2	144.0185	5.41726
		3	269.4815	22.16021

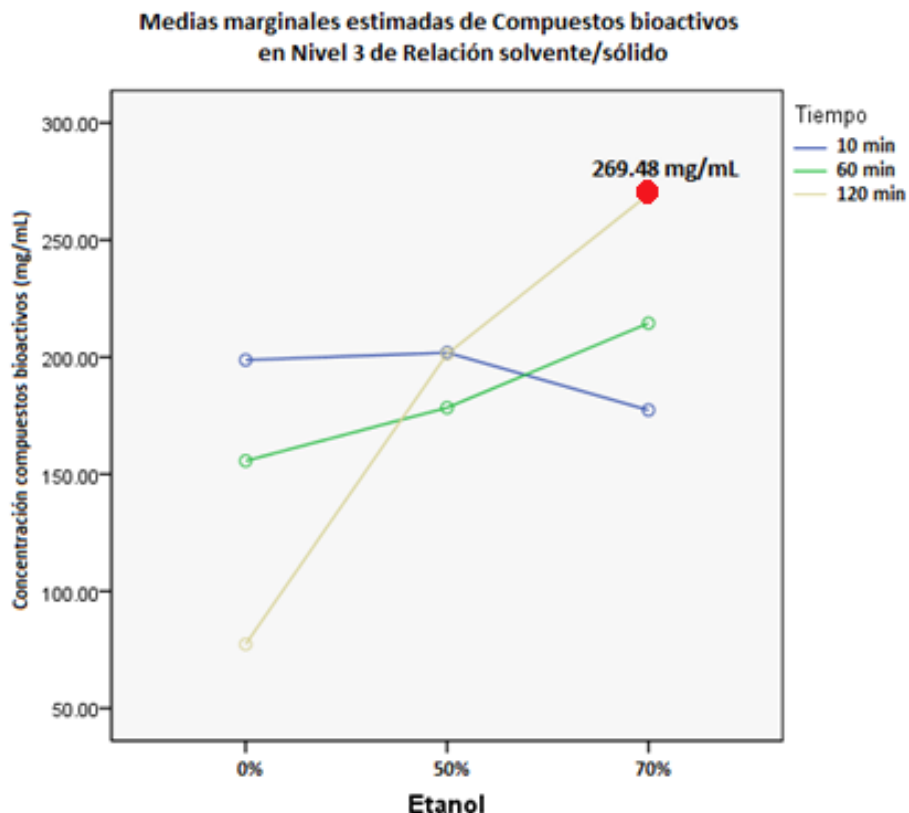


Figura 9. Interacciones entre los factores independientes y dependientes en la extracción UAE

Al emplear 70% de etanol acuoso se obtuvieron los mejores resultados y esto se explica porque el etanol es un buen absorbedor de ultrasonidos cuya eficiencia puede aumentarse al incluir pequeñas cantidades de agua, elevando la polaridad de la solución y mejorando la penetración del solvente a las células vegetales (Ghasemzadeh *et al.*, 2014).

Respecto al tiempo de extracción, con 120 min se obtuvo el mayor contenido de materia orgánica, esto puede deberse a que la cavitación en los métodos UAE generalmente conlleva tiempos desde 30 a 150 min, pues de esta manera se logra la transferencia de masa en todo el sistema (Vinatoru, 2001).

Por otra parte, la relación solvente:sólido que presentó un mejor rendimiento fue de 50:1 mL/g. Generalmente con pocas cantidades de solvente la cavitación puede no llevarse a cabo o en su defecto, puede presentarse con bajos niveles de eficiencia, es decir, a mayor cantidad de solvente se favorece la cavitación y la exposición de toda la matriz vegetal al campo de ondas ultrasónicas.

7.1.2. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MÉTODO MAE

Los efectos de las variables y los niveles correspondientes a la extracción MAE (**Tabla 11**) del análisis factorial completo 3x3x3 se presentan en la **Tabla 13**.

La **Tabla 12** presenta el análisis de varianza multifactorial donde se presentan los variables independientes que presentaron un efecto significativo sobre el rendimiento en los compuestos activos. Como se puede observar, el ANOVA descompone la variabilidad de la concentración de compuestos orgánicos en las contribuciones debidas a varios factores y las interacciones de éstos. Como P-Valor es menor a 0.05 para 2 factores, se comprueba con un nivel de confiabilidad del 95%, que la concentración de etanol y tiempo de extracción son las variables que más influencia tienen en la concentración de compuestos orgánicos, mientras que la relación solvente:sólido es la que menor influencia presentó en el experimento. Por otra parte, la **Figura 10** presenta las interacciones en el experimento, encontrando entonces que la mayor cantidad de materia orgánica se obtuvo bajo las siguientes condiciones: concentración de etanol al 95%, un tiempo de extracción de 31 minutos y una relación solvente:sólido de 5:1, con un rendimiento de 5.07% con 253.83 mg/mL de compuestos bioactivos.

Tabla 11. Factores y niveles evaluados en la extracción UAE

Variable independiente	Nivel		
	1	2	3
Concentración de etanol (%)	45	70	95
Tiempo de extracción (min)	1	16	31
Relación solvente:sólido (mL/g)	5:1	20:1	35:1

Tabla 12. Análisis de Varianza para la concentración de compuestos orgánicos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Concentración etanol	55434.0	2	27717.0	15.66	0.0000
B: Tiempo	18736.8	2	9368.39	5.29	0.0080
C:Relacion solvente:sólido	2784.37	2	1392.18	0.79	0.4606
INTERACCIONES					
AB	10399.2	4	2599.8	1.47	0.2245
AC	12435.4	4	3108.85	1.76	0.1512
BC	2087.25	4	521.812	0.29	0.8801
ABC	13961.8	8	1745.22	0.99	0.4572

Tabla 13. Variables respuesta del diseño factorial 3x3x3 en la extracción MAE

Concentración de etanol	Tiempo	Relación solvente/sólido	Compuestos bioactivos	Desviación típica
1	1	1	164.5741	7.54275
		2	146.5185	9.09625
		3	212.5370	23.78909
	2	1	156.0556	47.63464
		2	130.6852	4.72494
		3	121.5185	11.99708
	3	1	176.7037	14.40790
		2	171.7037	9.06226
		3	250.1296	21.19197
2	1	1	142.7222	40.89376
		2	147.1667	1.54660
		3	145.5000	41.58418
	2	1	156.2407	5.43148
		2	151.7037	2.99605
		3	177.3519	62.46625
	3	1	107.1667	17.67767
		2	190.5926	2.52049
		3	161.4259	12.86304
3	1	1	228.1852	18.89978
		2	206.8889	2.92657
		3	189.4815	25.80993
	2	1	241.4259	35.14118
		2	228.9259	8.82937
		3	197.2593	68.01435
	3	1	253.8333	26.74612
		2	223.1852	5.31662
		3	231.2407	28.51837

En comparación con las demás concentraciones de etanol, a 95% se encontraron los mejores resultados puesto que los solventes polares muy altos evitan la extracción de impurezas y compuestos no polares, así también, el etanol presenta una mejor capacidad en la absorción de microondas y transferencia de masa y por ende una mayor eficiencia de extracción (Veggi *et al.*, 2013).

De los tres tiempos de extracción probados se encontró que con 31 min se obtuvo el mayor rendimiento 253.83 mg/mL, sin embargo un tiempo de 16 min pudo ser suficiente para lograr una buena extracción, pues el rendimiento obtenido fue de 241.52 mg/mL. Aplicar 16 min de radiación de microondas y no 31 minutos podría beneficiar el proceso en la reducción de costos experimentales por el menos tiempo de extracción y de energía requerida, de igual forma podría evitarse la degradación de compuestos que generalmente se presenta en tiempos prolongados de irradiación (Khoddami *et al.*, 2013; Veggi *et al.*, 2013).

En cuanto a la relación solvente:sólido 5:1, aun cuando no resulta ser un factor crítico en esta investigación, se observa que el volumen de disolvente fue suficiente para que la materia vegetal quedara inmersa en él durante todo el procedimiento, obteniendo entonces una extracción completa, así mismo, mayores volúmenes de solvente requieren más energía y tiempo para calentarse y llevar a cabo la extracción de los compuestos. Por lo tanto la relación óptima de solvente:sólido se presentó a 5:1 mL/g.

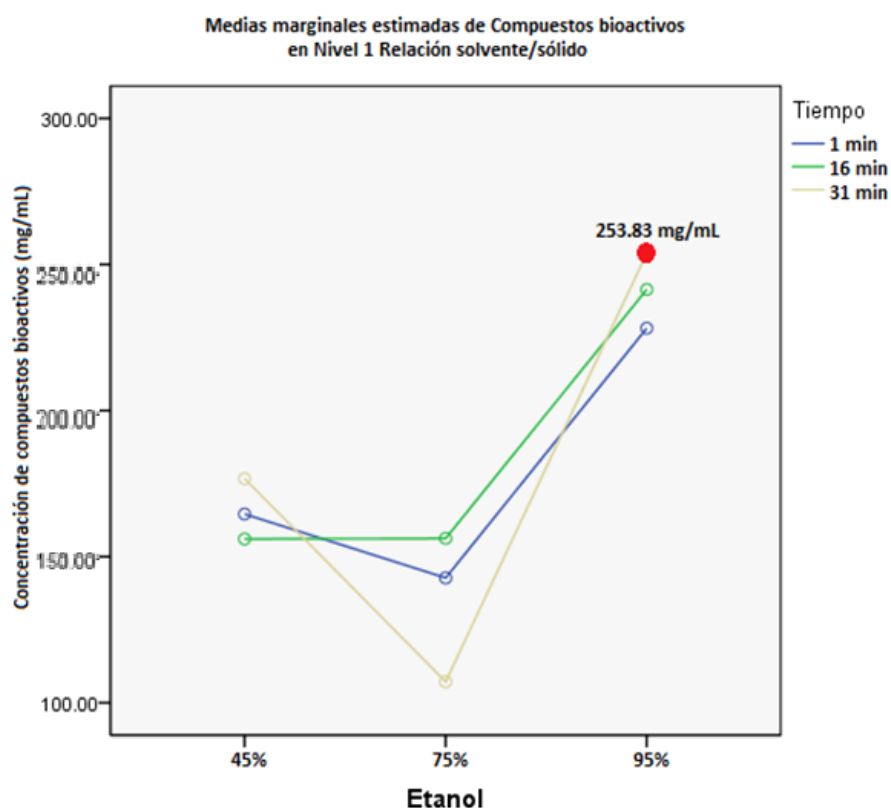


Figura 10. Interacciones entre los factores independientes y dependientes en la extracción MAE

Comparando los rendimientos de ambos métodos de extracción asistidos por ultrasonido (5.38%) y microondas (5.07%) y las condiciones a las cuales se obtienen los mejores resultados, se observa que los requerimientos en la extracción UAE como la cantidad de solvente por g de materia seca (50ml/g) y tiempo de extracción (110 min) son mayores que los requerimientos utilizados en la extracción MAE con 5 mL/g de materia seca y 31 min, por lo tanto el método de extracción asistido con microondas (MAE) resulta ser el más económico al observarse un ahorro considerable de solventes y energía de irradiación con un rendimiento casi equiparable al obtenido por la extracción asistida por ultrasonido (UAE).

7.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

7.2.1. PRUEBA DE HALO DE INHIBICIÓN

Ambos extractos UAE y MAE mostraron un efecto antimicrobiano dependiente del microorganismo probado. Los halos de inhibición se presentan en la **Tabla 14**.

Se encontró que el extracto UAE tuvo el mayor efecto en los microorganismos probados, siendo más susceptibles los microorganismos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* (FM774) con un halo de 16 mm y los microorganismos menos susceptibles a este extracto fueron *Candida parapsilosis* y *Trichophyton rubrum* (FM794) con 7 mm, es decir, tan sólo 1 mm mayor al diámetro del disco de papel filtro. En cuanto al extracto MAE el microorganismo más susceptible fue nuevamente *Trichophyton rubrum* (FM774) con un halo de 12 mm, mientras que los microorganismos menos susceptibles fueron *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum* (FM794, FM941 y FM943) y *Trichophyton mentagrophytes* (FM796) con 7 mm.

La **Figura 11** presenta una comparación de los valores obtenidos en los halos de inhibición para las 14 cepas analizadas con los extractos UAE y MAE, demostrando que el extracto UAE presentó mayores halos de inhibición que los obtenidos por el extracto MAE.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de los extractos mostrada en zonas de inhibición en mm.

Microorganismos	MAE	UAE
<i>S. aureus</i>	8	9
<i>C. albicans</i>	9	10
<i>C. parapsilosis</i>	7	7
<i>T. rubrum</i>	10	13
<i>T. mentagrophytes</i>	9	16
FM309	11	12
FM626	8	11
FM774	12	16
FM794	7	7
FM796	7	10
FM932	10	14
FM934	8	14
FM941	7	12
FM943	7	9

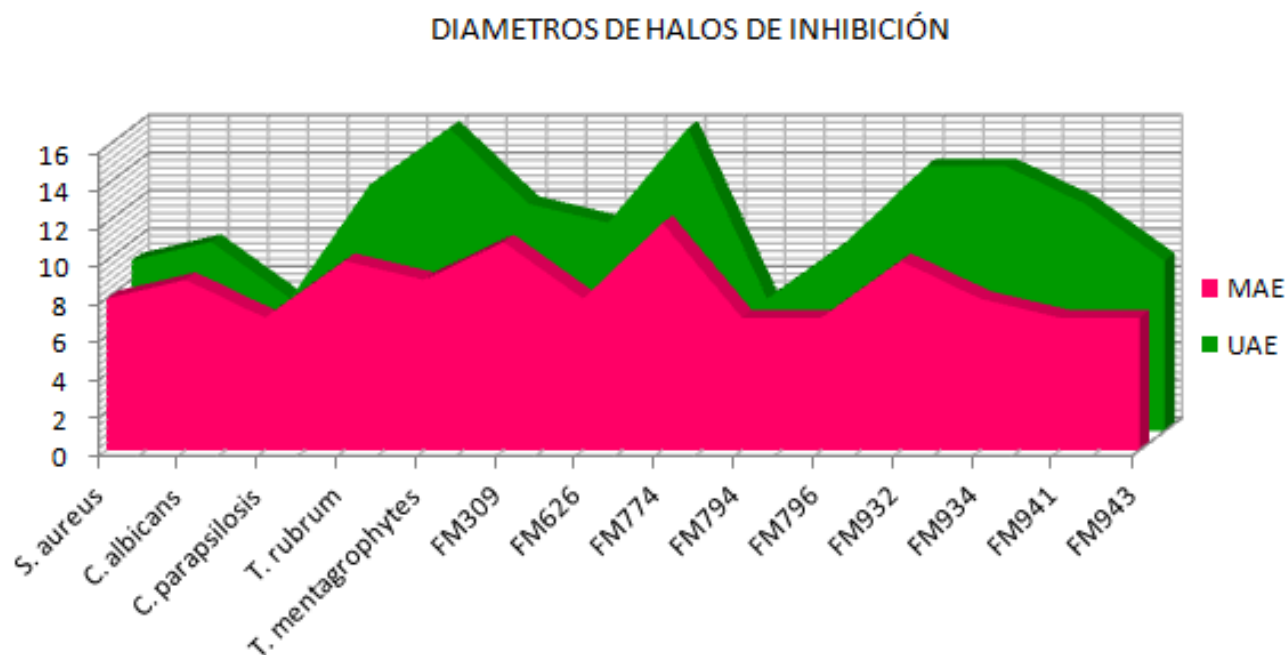


Figura 11. Halos de inhibición con extractos UAE y MAE

7.2.2. PRUEBA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Los extractos UAE y MAE de *Agave nussaviorum* probados por primera vez, inhibieron el crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y los 9 aislados clínicos de la especie *Trichophyton rubrum*, para el extracto UAE se tuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 0.25 a 1 mg/mL y concentraciones fungicidas o bactericidas de 0.4 hasta 1 mg/mL; mientras que para el extracto MAE se obtuvieron CMI de 0.4-1 mg/mL y CMF o CMB de 0.5 a 1 mg/mL.

La **Tabla 15** concentra la actividad antifúngica de los extractos en las cepas evaluadas. Como se puede observar, los extractos MAE y UAE presentan valores de CMI similares, siendo *Candida parapsilosis* la cepa más susceptible a ambos extractos (**Figura 12**). Los extractos presentaron una notable actividad antifúngica teniendo concentraciones inhibitorias y letales de 1 mg/mL incluso en los microorganismos más resistentes. Previamente Hammuel *et al.*, (2011) probaron el efecto inhibitorio de extractos de *Agave sisalana*, obteniendo en la prueba de halo de disco diámetros de inhibición de ente 25 y 29 mm con discos de 6 mm de diámetro, sin embargo, la concentración necesaria para formar estos halos fue mayor, de hecho las CMI obtenidas oscilaron en concentraciones de extracto de entre 10 y 20 mg/mL y sólo se mostró un efecto letal en concentraciones entre 20 y 40 mg/mL. Posteriormente Ribeiro en 2013 comprobó un efecto antifúngico a partir de Sisal con una concentración mínima inhibitoria de hasta 12 mg/mL.

Diversos trabajos demuestran que los extractos obtenidos de diversas especies de *Agave* poseen actividad antifúngica y antibacteriana (Yang *et al.*, 2006).

De acuerdo a la literatura, Verástegui *et al.*, en 2008, reportó valores de CMI de 2 mg/mL de extractos de especies de *Agave lecheguilla*, *Agave picta*, *Agave scabra* y *Agave lophanta* contra hongos filamentosos y levaduras. De igual manera, Ahumada-Santos *et al.*, 2013, describió la actividad bacteriana de *Agave americana* y *Agave schidigera* con CMI de 5 mg/mL.

Las CMI obtenidas en este estudio fueron inferiores a las reportadas previamente y son alentadoras para su uso en el tratamiento de onicomycosis, pues las concentraciones fueron comparables con aquellas a las cuales son efectivas la anfotericina B y la gentamicina, utilizados como controles negativos en los análisis, confirmando con ello

los efectos terapéuticos contra la onicomicosis observados por los pobladores en el uso medicinal tradicional de *Agave nussaviorum*.

La actividad antifúngica en *Agave* spp. ha sido asociada a la presencia de taninos, alcaloides, flavonoides y saponinas esteroidales (Armah *et al.*, 1999; Ahumada Santos, 2013). Se sugiere que los metabolitos secundarios se unen formando complejos con ergosterol, lo que puede formar poros y daña la integridad de la membrana, ocasionando la pérdida de iones, azúcares y otros compuestos intracelulares esenciales, hasta causar la muerte celular (Vanden-Bossche, 1997; Ribeiro, 2013).

Tabla 15. Actividad antifúngica de extractos MAE y UAE (CMI/CMF, mg/mL)

Método de extracción	MAE			UAE		
Cepas	IC ₅₀	CMI	CMF	IC ₅₀	CMI	CMF
<i>C. albicans</i>	0.68	1	1	0.73	1	1
<i>C. parapsilosis</i>	0.37	0.4	1	0.073	0.25	1
<i>S. aureus</i>	0.42	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>T. rubrum</i>	0.83	1	1	0.65	1	1
<i>T. mentagrophytes</i>	0.81	1	1	0.45	0.75	1
FM309	0.43	0.5	0.5	0.35	0.75	0.75
FM626	0.55	0.75	0.75	0.63	0.75	0.75
FM774	0.4	0.5	0.75	0.28	0.4	0.4
FM794	0.5	1	1	0.6	1	1
FM796	0.47	1	1	0.48	1	1
FM932	0.46	0.5	0.5	0.17	0.5	0.5
FM934	0.07	0.75	0.75	0.28	0.5	1
FM941	0.2	0.4	0.75	0.25	0.75	0.75
FM943	0.63	1	1	0.75	1	1

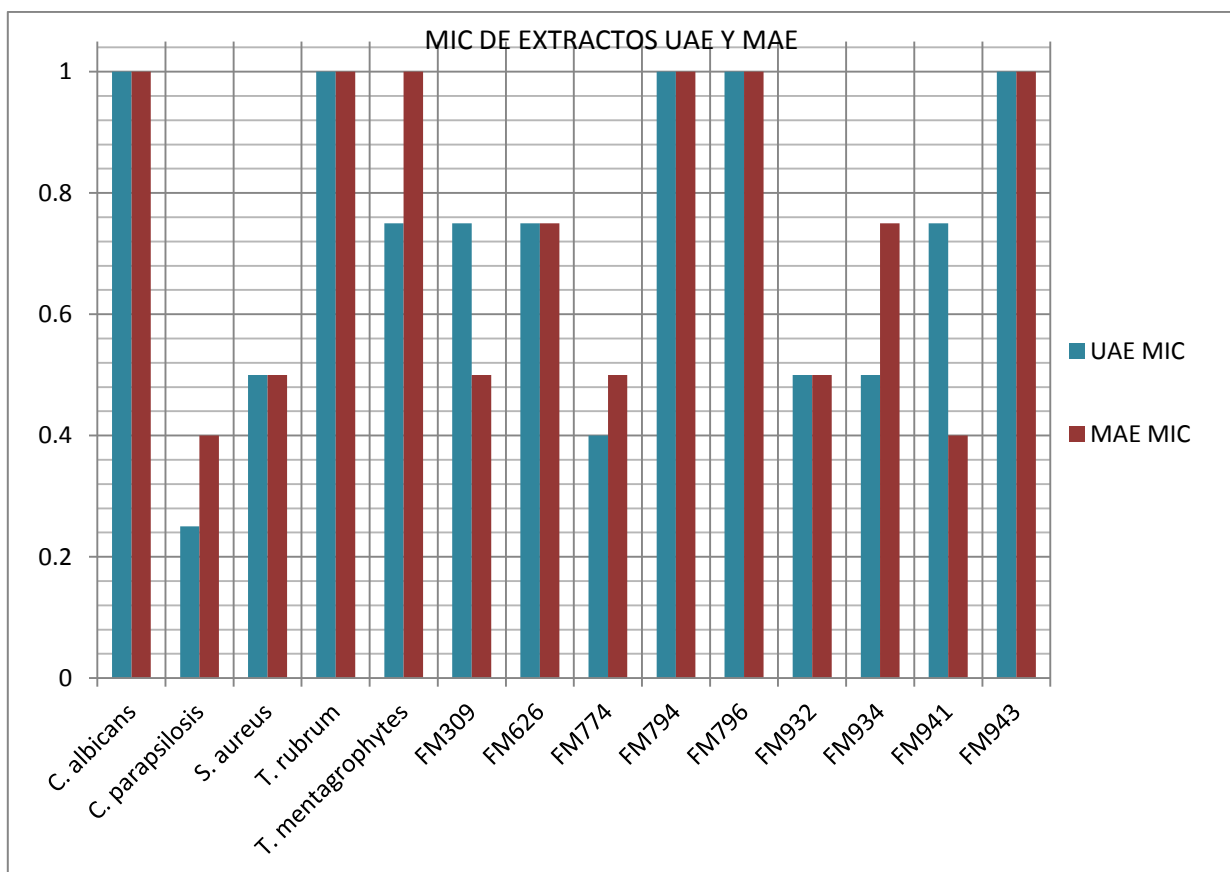


Figura 12. Concentración mínima inhibitoria con extractos MAE y UAE

Retomando lo observado en la medicina tradicional, previamente Allsopp *et al.*, (2013) observaron que la inulina obtenida de *Agave angustifolia*, tuvo un efecto protector en el colon, al aumenta la población de bifidobacterias. Por lo que la importancia de realizar más estudios con esta planta deja abierta la posibilidad de adicionales usos terapéuticos de los compuestos obtenidos a partir de *Agave nussaviorum*.

7.3. ANÁLISIS QUÍMICOS DE LOS EXTRACTOS

Sabiendo que la familia Agavacea es rica en fenoles azúcares reductores, terpenos, esteroides, flavonoides y saponinas (Ahumada-Santos *et al.*, 2013) se realizó la identificación siguiendo el diagrama de flujo presentado en la **Figura 13**.

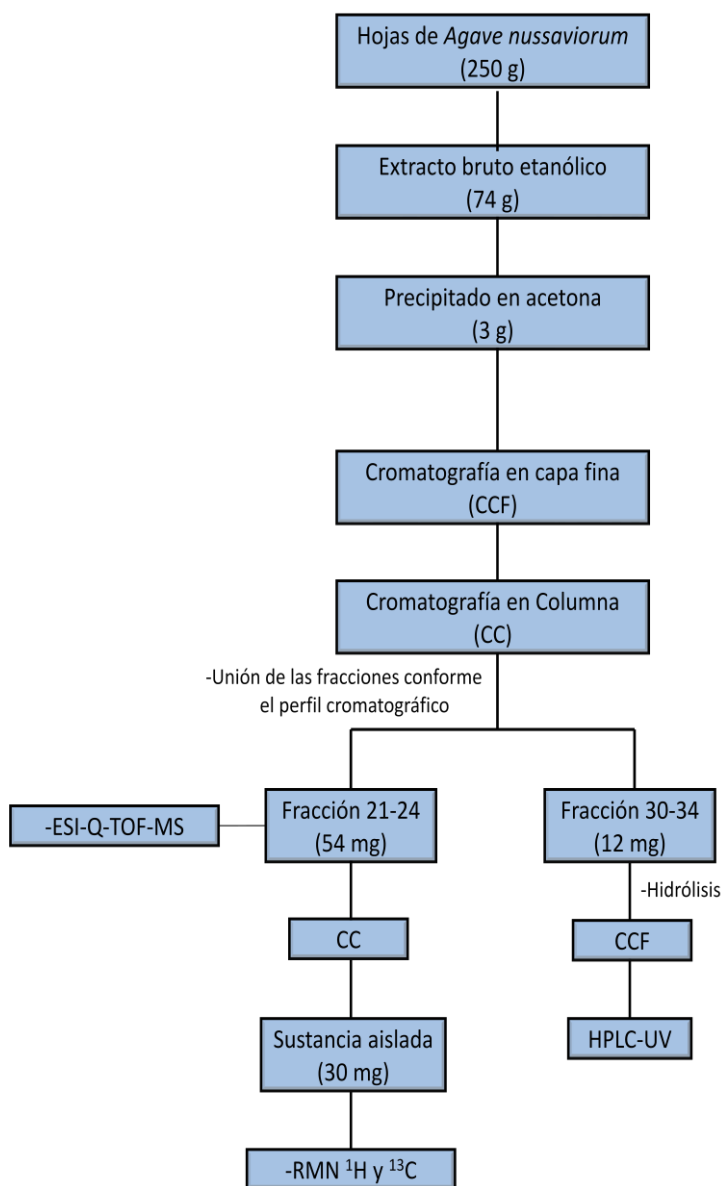


Figura 13. Diagrama de aislamiento e identificación de los compuestos de *Agave nussaviorum*

Inicialmente se realizó un análisis en CCF de ambos precipitados obtenidos por MAE y UAE, observando en cada revelado el mismo perfil cromatográfico, con los mismos

compuestos mayoritarios y presentando ambos el mismo valor de Rf, por lo tanto se procedió a reunir ambos precipitados (**Figura 14**).

A través de la CCF, con el uso de reveladores y eluyentes específicos para la identificación de los metabolitos secundarios, fue posible observar la presencia de flavonoides, terpenos/esteroles y azúcares, pues se verificó la coloración característica de estos metabolitos secundarios.

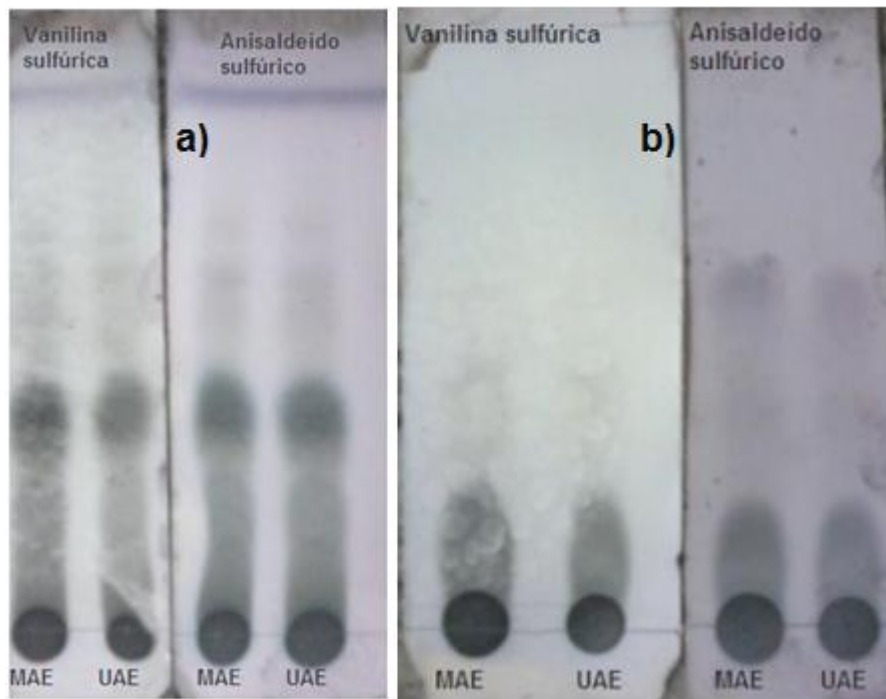


Figura 14. CCF de los extractos MAE y UAE
Fase móvil: a) cloroformo, ácido acético glacial, metanol y agua (60:32:12:8) b) acetato de etilo, ácido acético, agua (20:2:2)
Revelador: Anisaldehído sulfúrico y Vainillina sulfúrica

7.3.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE INULOBIOSA

La fracción acuosa precipitada en acetona fue sometida a un fraccionamiento en columna cromatográfica conteniendo Sephadex LH-20, eluída con metanol (Columna PCR) (**Figura 15**) resultando en la obtención de 34 fracciones, que fueron posteriormente analizadas por CCF y reunidas en fracciones de perfiles cromatográficos semejantes (**Figura 16**), las fracciones PCR 21-24 fueron sometidas a un nuevo fraccionamiento en CCF bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas (**Figura 17**). Las fracciones denominadas PCR 21-24 presentaron apenas una banda

en CCF y una masa de 30 mg. El análisis de la misma por ESI-Q-TOF MS presentó picos mayoritarios referentes a los pseudo-iones moleculares $[M+Na]^+$ en 365,108 m/z y 527,1567 m/z, característicos de los disacáridos ($C_{12}H_{22}O_{11}$) y trisacáridos ($C_{18}H_{32}O_{16}$) respectivamente (**Figura 18**).



Figura 15. Columna PCR conteniendo Sephadex LH-20 como fase estacionaria.
Precipitado acuoso de *Agave nussaviorum*, Eluente Metanol

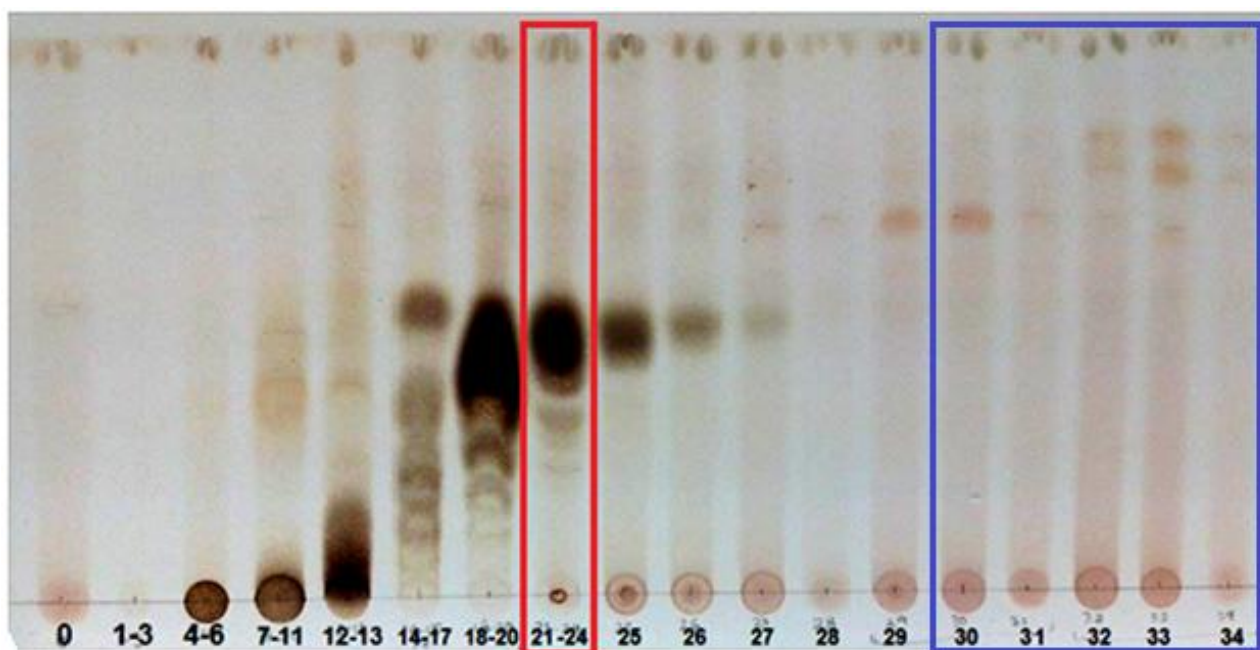


Figura 16. CCF con fracciones PCR de la columna. Fase móvil: cloroformo, ácido acético glacial, metanol y agua (60:32:12:8). Revelador: vainillina sulfúrica

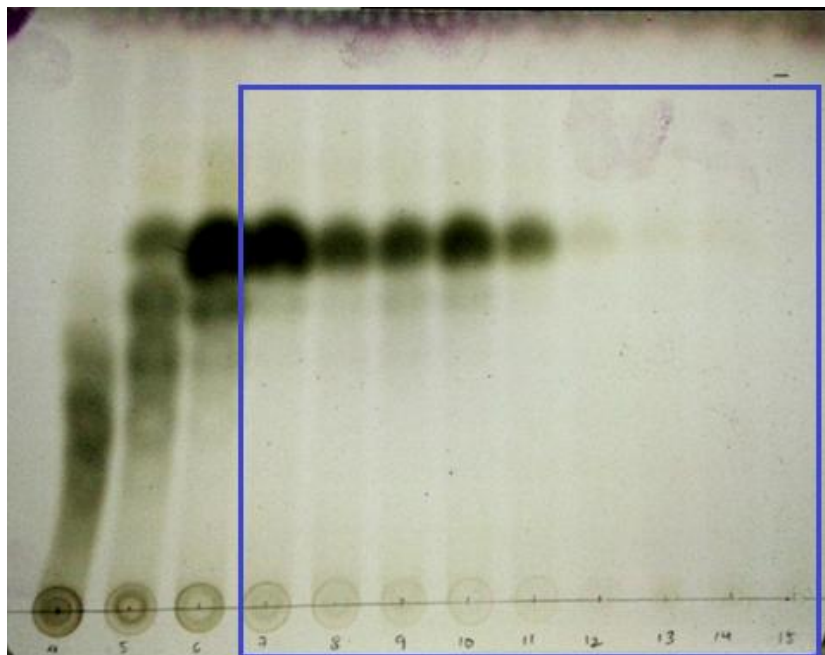


Figura 17. CCF con fracciones PCR1. Fase móvil: cloroformo, ácido acético glacial, metanol y agua (60:32:12:8). Revelador: Vainillina sulfúrica

Las unidades monosacáridas fueron confirmadas por el análisis en RMN de la fracción PCR.1 7-15. A pesar de contener mayoritariamente sacarídeos con grado de polimerización igual a 2 y 3, fue posible observar en el espectro de RMN (**Figuras 19, 20 y 21**).

El género *Agave* produce oligosacaridos denominados fructanos, que pueden ser del tipo inulina o levano. Estos oligosacáridos son caracterizados por la polimerización de unidades β -D-fructofuranosa realizando una ligación $\beta(2\rightarrow1)$, característica de la inulina, y/o $\beta(2\rightarrow6)$, características de levanos, ligadas a una unidad de α -D-glicosa terminal o intermediaria (Stéphane, 2004). Los productos de la hidrólisis enzimática de los fructanos son denominados fructooligosacaridos y son caracterizados por la ausencia de unidades de glicosa y la presencia de una unidad de fructosa reducida, realizando una ligación $\beta(1\leftarrow2)$ con otra unidad de fructosa en cadena. Los fructooligosacaridos que han sido aislados del género *Agave* son la inulobiosa (DP=2), inulotriosa (DP=3) y la inulotetrosa (DP=4) (Norio, 1990).

Mass Spectrum SmartFormula Report

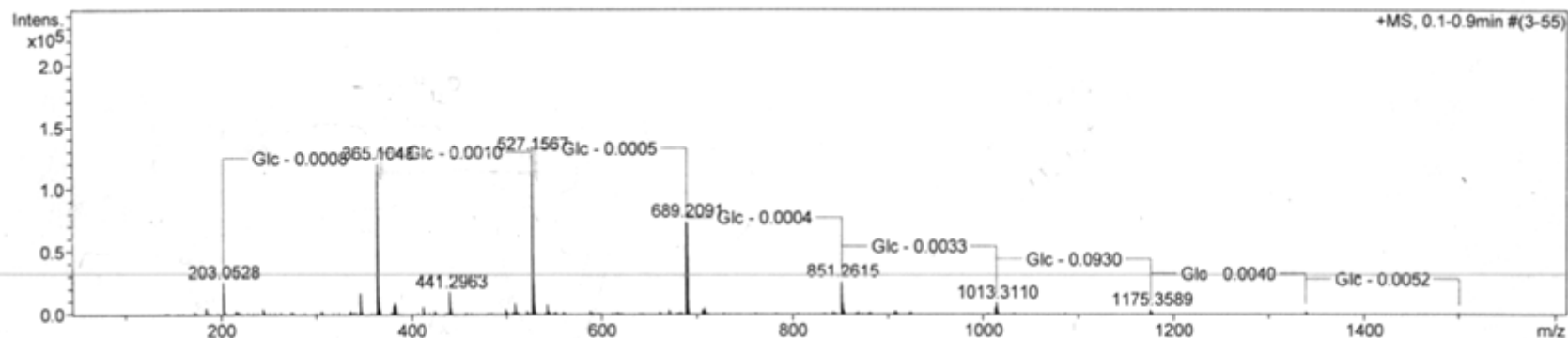
Analysis Info

Analysis Name: D:\Data\Usuarios\Externas\RicardoD_PBV-CCS-UFRJ_pos_SAPO-1_23-05-14.d
 Method: NaFormate_ESI_pos_160-1600_Lab-Mass.m
 Sample Name: RicardoD_PBV-CCS-UFRJ_pos_SAPO-1_23-05-14
 Comment: Fluxo: 180uL/h
 Faixa de varredura: 160-1600
 FM proposta: Desconhecido
 MM:-
 M+H:-
 M+Na:-
 2M+H:-
 2M+Na:-

Acquisition Date: 5/23/2014 4:01:36 PM
 Operator: LabMass-Central Analitica IPPN
 Instrument / Ser#: micrOTOF 10368

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	1600 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	mSigma	rdB	e ⁻ Conf	N-Rule
185.0413	1	C 6 H 10 Na O 5	100.00	185.0420	3.8	4.6	67.8	1.5	even	ok
203.0528	1	C 6 H 12 Na O 6	100.00	203.0526	-1.1	-1.1	13.0	0.5	even	ok
347.0944	1	C 12 H 20 Na O 10	100.00	347.0949	1.5	0.8	22.7	2.5	even	ok
365.1048	1	C 12 H 22 Na O 11	100.00	365.1054	1.6	1.6	5.0	1.5	even	ok
441.2963	1	C 26 H 42 Na O 4	100.00	441.2975	2.7	3.0	8.0	5.5	even	ok
509.1461	1	C 18 H 30 Na O 15	100.00	509.1477	3.1	2.9	17.4	3.5	even	ok

Figura 28. ESI-Q-TOF MS de la fracción PCR 21-24

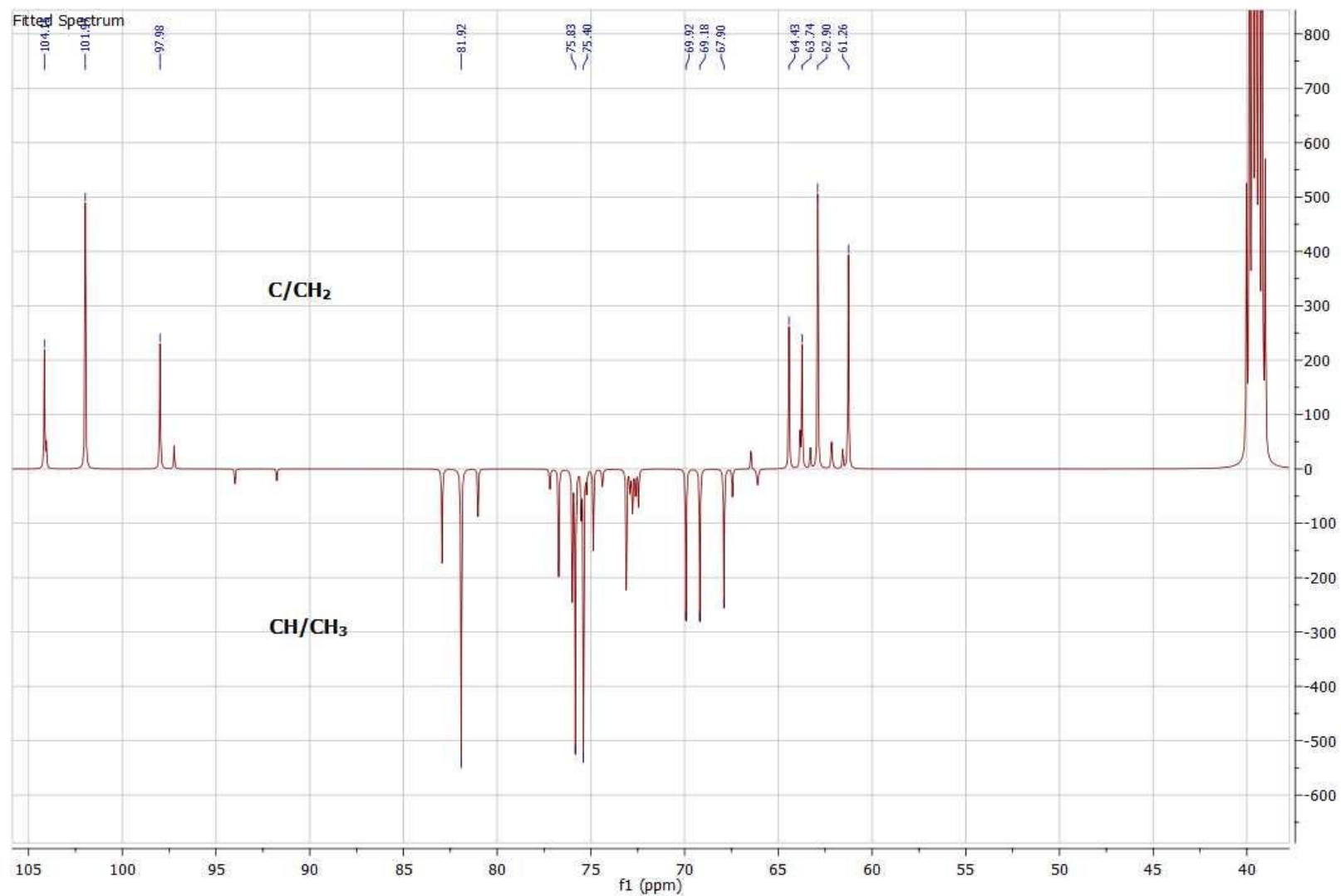


Figura 19. Espectro de RMN de C13 de la fracción PCR1 7-15

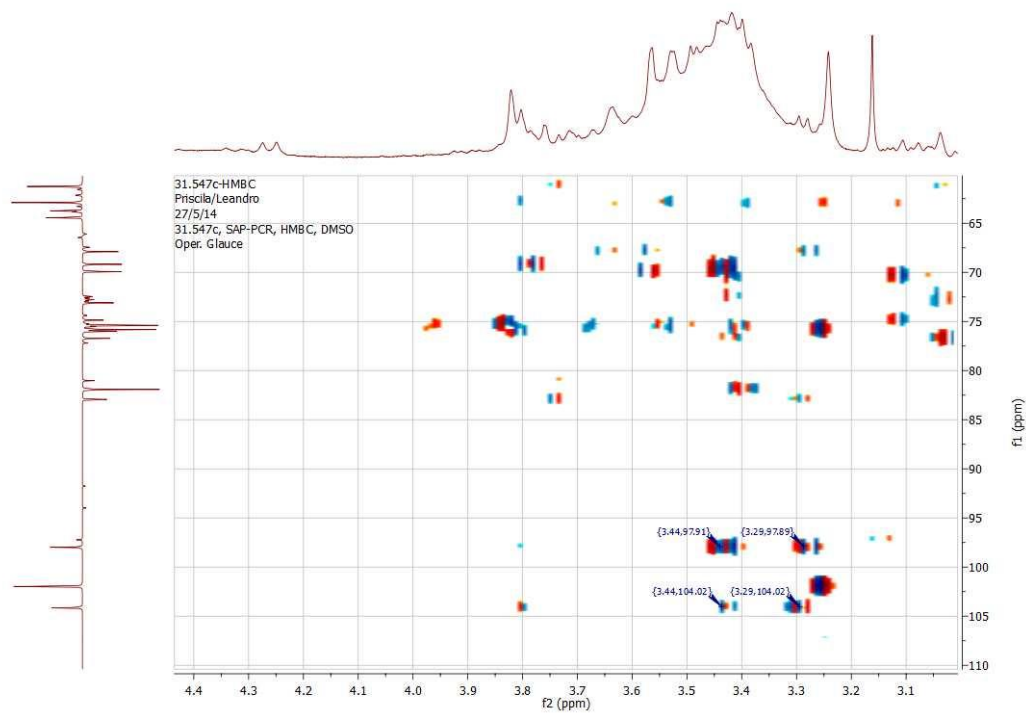


Figura 20. Espectro de RMN 2D HMBC de la fracción PCR.1 7-15

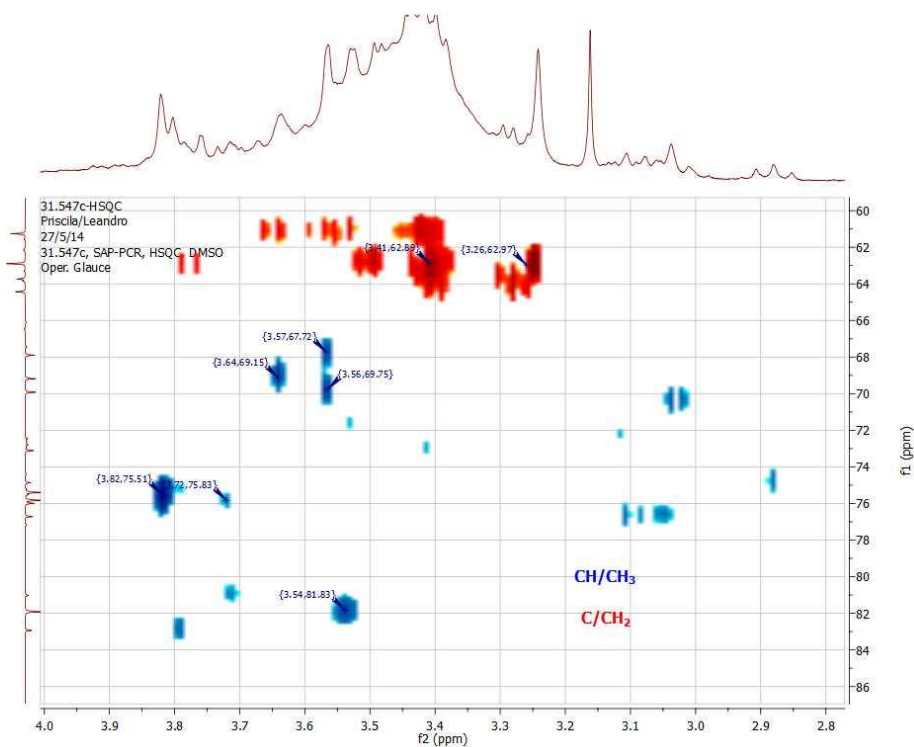


Figura 21. Espectro de RMN 2D HSQC de la fracción PCR.1 7-15

A través de los métodos cromatográficos, fue posible aislar una muestra conteniendo inulobiosa, evidenciada por los desplazamientos químicos de C13 APT, las correlaciones de HSQC y HMBC, comparados con los datos pertenecientes a la inulobiosa descritos anteriormente en la literatura (Yojiro, 2009).

Es posible evidenciar en el espectro de 13C APT la presencia de residuo de fructosapiranos que realiza una ligación química de las correlaciones entre H1a y H1b con los carbonos anoméricos de fructosafuranosa ($\delta = 94-104$ ppm) y fructosapiranos. Estas correlaciones indican la presencia de ligación entre C1 de la fructopiranos con el C2' de la unidad de fructosafuranosa. Las correlaciones encontradas en los espectros y su comparación con la literatura se encuentran en la **Tabla 16** y en la **Figura 22**.

Tabla 16. Comparación de los desplazamientos químicos de la inulobiosa y la sustancia aislada

	Artículo (H ₂ O deuterada)	Sustancia Aislada (DMSO deuterado)	HSQC	HMBC
	δ C	δ C APT	δ H	δ H
C1	64,6	64,4	3,41-3,28	C2,C3
C2	98,66	97,89		
C3	68,95	67,9	3,55	C4
C4	70,28	69,9	3,55	C3
C5	69,9	69,2	3,65	C3,C4
C6	64,27	63,74	3,41-3,28	
C1'	61,16	61,26	3,66-3,41	C2'
C2'	104,45	104,15		
C3'	77,96	75,89	3,73	C1'
C4'	75,07	75,35	3,83	C3'
C5'	82	81,9	3,54	C6',C4'
C6'	62,79	62,9	3,25-3,42*	C5',C4'

(Yojiro & Ishiguro, 2009)

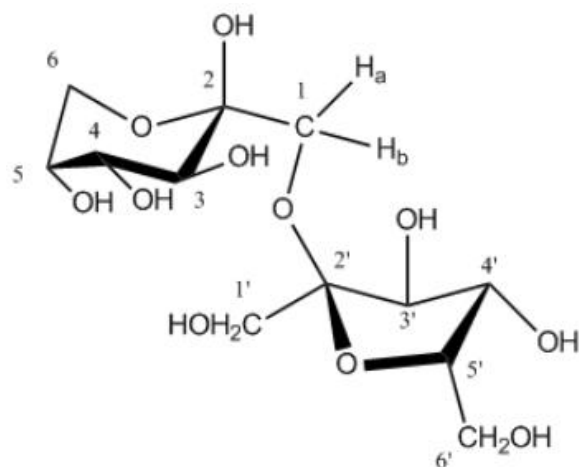


Figura 22. Fórmula estructural de la inulobiosa.

7.3.2. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Las fracciones PCR 30-34 (12 mg) de la columna cromatográfica PCR (**Figura 16**) fueron recolectadas, sometidas a CCF usando como fase móvil del sistema: acetato de etilo, ácido fórmico y agua (20:2:2) y revelador NP/PEG, siendo posible verificar la presencia de compuestos fenólicos, con la coloración característica para el grupo de metabolitos secundarios de los flavonoides.

Las fracciones PCR 30-34 fueron sometidas a CCF, realizada bajo el siguiente sistema de solventes: acetato de etilo, ácido fórmico y agua (20:2:2) y asperjadas con NP/PEG, fueron aplicados 2 padrones: quercitrina (quercetina 3-o-ramnosideo) y rutina con isoquercitrina (glicosilados de quercetina), verificando la presencia de flavonoides probablemente monoglicosilados, diglicosilados y por ácidos fenólicos con un R_f próximo a 0.5 y de coloración fluorescente en el complemento de onda de 365 nm (**Figura 23**).

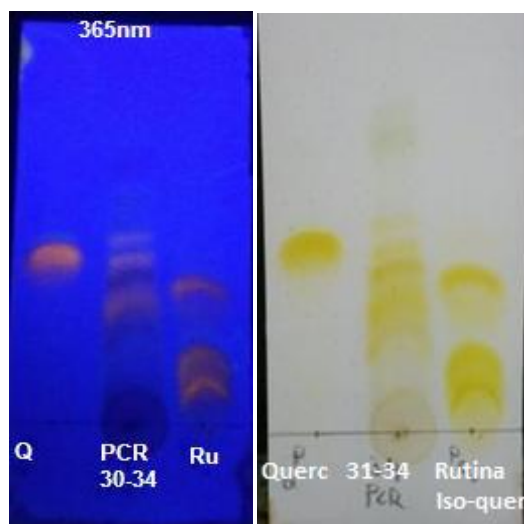


Figura 23. CCF de fracción PCR 30-34. Eluyente: acetato de etilo, ácido fórmico y agua (20:2:2). Revelador: NP/PEG

10 mg de las fracciones PCR 30-34 fueron sometidos a una hidrólisis en HCl 0.1M por 1 horas a 100°C en agitación continua, las agliconas fueron extraídas por partición con acetato de etilo y sometidas a un análisis por CCF cuyo perfil se presenta en la **Figura 24**, bajo el eluyente: tolueno, acetato de etilo, ácido fórmico (7:2:1), asperjadas con revelador NP/PEG y visualizado con lámpara UV 365 nm. A través del análisis fue posible evidenciar 2 agliconas mayoritarias de flavonoides. La comparación del valor Rf de ambas sustancias con el Rf del padrón sugiere la presencia de un flavonoide con una estructura química semejante a la quercetina.

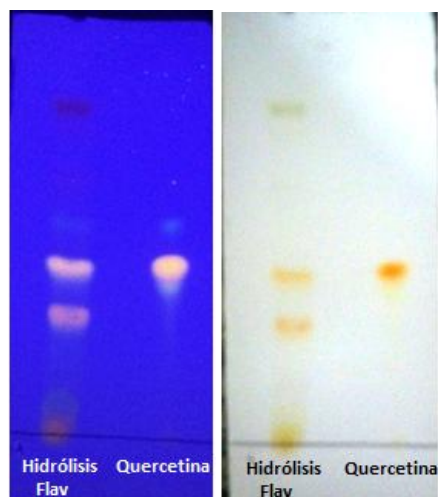


Figura 24. CCF del compuesto hidrolizado de fracción PCR 30-34. Eluyente: tolueno, acetato de etilo, ácido fórmico (7:2:1). Revelador: NP/PEG.

El fraccionamiento por HPLC-UV utilizando como fase móvil A una solución acuosa 0.1% en ácido trifluoroacético y como fase móvil B acetonitrilo. A través del análisis de los cromatogramas y los respectivos espectros de UV de las señales analizadas en la fracción hidrolizada 30-34, fue posible evidenciar la presencia de sustancias que poseen un espectro de absorción en la región ultravioleta próximo al complemento de onda de 254 nm, característico de compuestos fenólicos como algunos ácidos fenólicos y diversos flavonoides (Souza *et al.*, 2005).

El cromatograma fue fijado en los siguientes complementos de onda: 254, 280 y 365 nm para la visualización de los picos que presentaron absorbancia en esas regiones (**Figura 25**).

Fue posible evidenciar la presencia de 2 sustancias mayoritarias que poseen absorbancia en la región 280 nm (sustancia 1) y otra en las regiones 254 y 365 nm (sustancia 2) (**Figura 26**). Las sustancias minoritarias de la fracción presentaron absorbancia en los complementos de onda de 254 y 365 nm (característico de los flavonoides), mas no en 280 nm (característico de dihidroflavonoides o isoflavonas) (**Figura 26**). Los tiempos de retención de todas las sustancias se concentran en la **Tabla 17**.

Por otra parte, la quercetina presentó un tiempo de retención de 36.42 min, mientras que la sustancia 3 es de 36.56 min, es decir, el tiempo de retención de ambas muestras fue parecido, sin embargo el espectro UV presenta un bandas diferentes.

Tabla 17. Tiempos de retención y picos máximos de las Sustancias 1-5

Tiempo de retención (min)	Substancia	λ (nm)
27.73	4	260 y 352
29.41	5	268 y 335
32.66	2	257 y 342
34.33	1	282
36.56	3	274 y 364

Sun *et al.*, 2007, mencionan que los flavan-3-oles y dihidroflavonoides muestran la presencia de un solo pico con una longitud de onda de 280 nm, al igual que la Sustancia 1 que resultó ser mayoritaria en la fracción analizada de *Agave nussaviorum*.

Un flavonol presenta una doble ligación en el anillo C, mientras que los dihidroflavonoides no presentan aquella doble ligación, sin embargo los flavanoles no presentan un grupo funcional cetónico en el anillo intermedio, mientras que los dihidroflavonoides y los flavonoles si. Lo que podría sugerir que la Sustancia 1, puede tratarse de un dihidroflavonol debido a la presencia del grupo funcional cetona en el anillo intermedio y la ausencia de una doble ligación. La presencia de una flavanona puede descartarse por la ausencia de la doble ligación, el grupo funcional cetona y el grupo funcional alcohol, sin embargo Sun *et al.*, 2007, mencionan que las flavanonas generalmente presentan bandas a 284-290 nm.

La Sustancia 2 podría tratarse de isoflavonas, las cuales han sido identificadas en algunas especies como *Agave sisalana* que generalmente presentan absorción en la región característica de 245-270 y 300-350nm (Papadopoulou *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). Por otra parte, la Sustancia 3, podría tratarse de un flavonol o una chalcona, mientras que las Sustancias 4 y 5 podrían tratarse de flavonoles, todos ellos ya han sido relatados en especies del género *Agave*. La **Figura 27** muestra algunos posibles núcleos de las sustancias observadas por HPLC. El género *Agave* es conocido por la producción de dihidroflavonoides, flavonoides y ácidos fenólicos (Almaraz-Abarca *et al.*, 2009) cuyas actividades han sido reconocidas por sus efectos antifúngicos, antimicrobianos, antioxidantes entre otros.

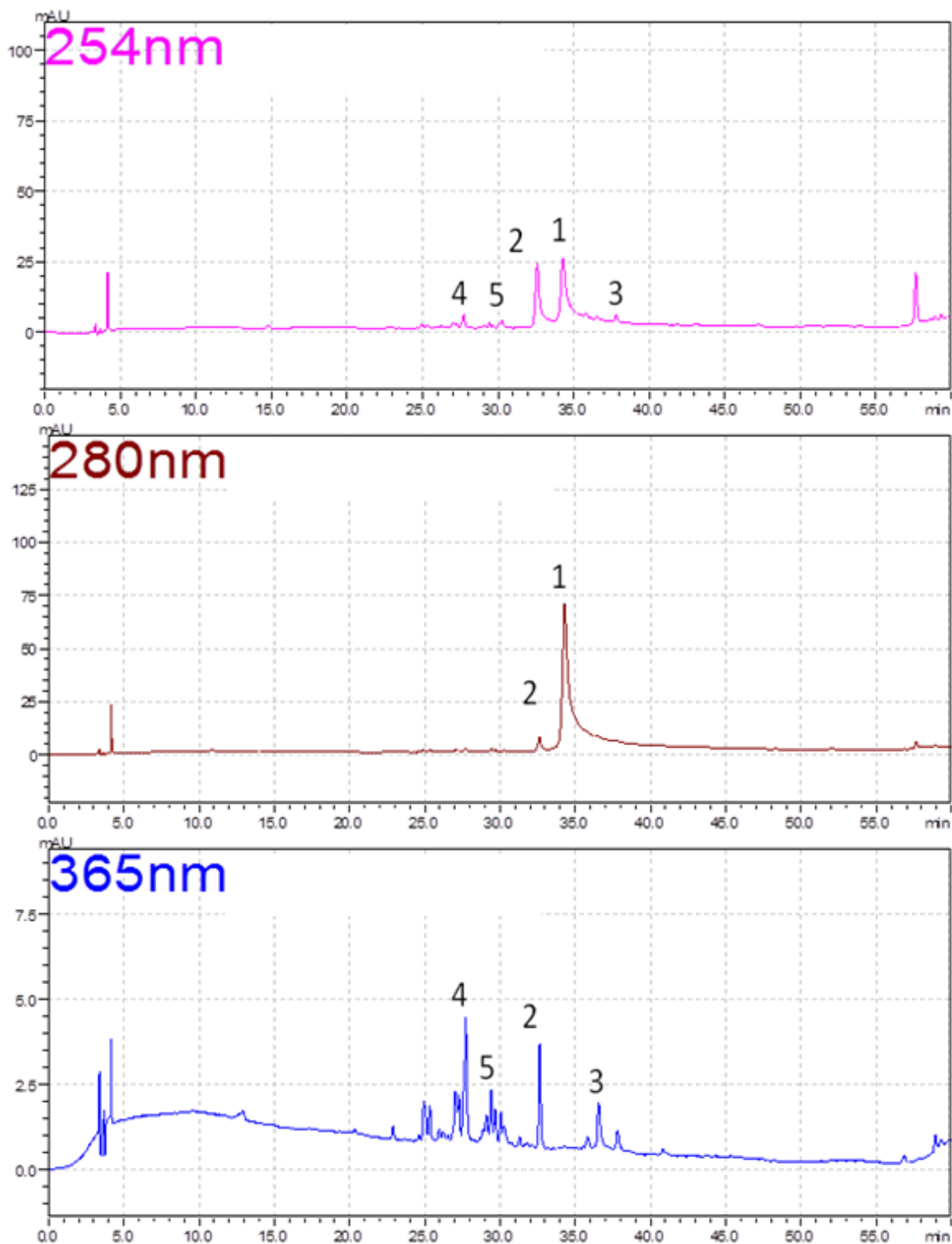


Figura 25. Cromatogramas de la fracción PCR 30-34 de *Agave nussaviorum* visualizados en diferentes complementos de onda

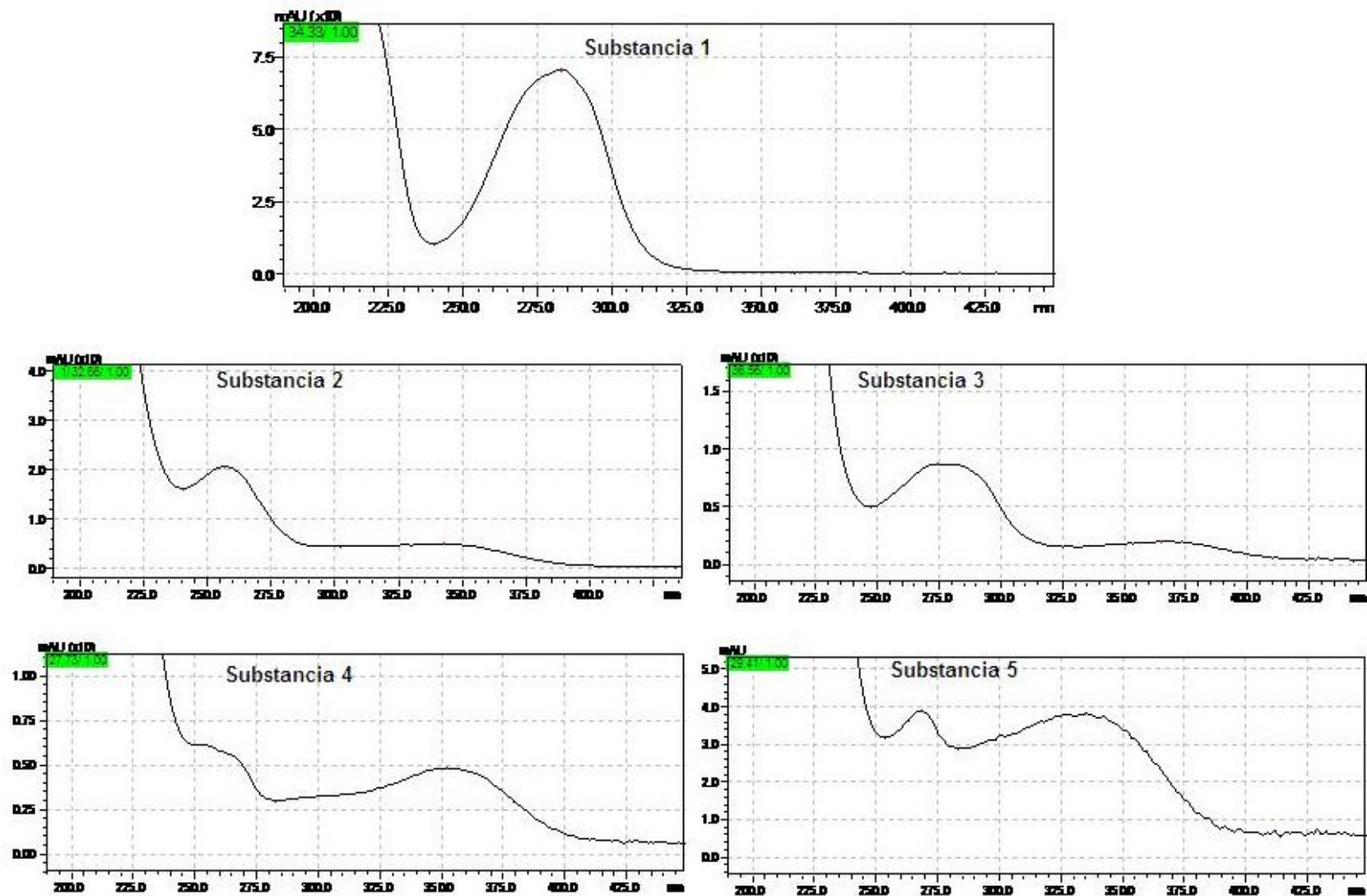


Figura 26. Espectros de absorción de UV de las Sustancias 1 -5

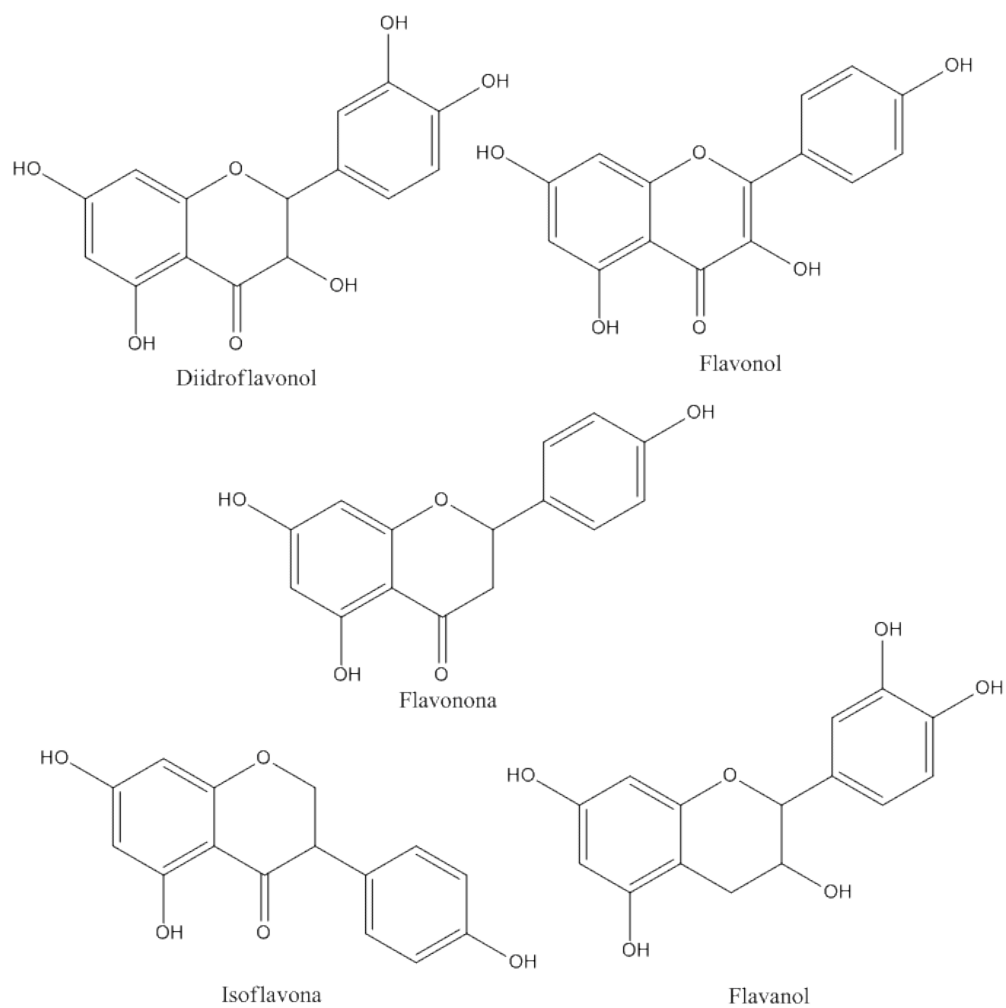


Figura 27. Posibles núcleos de las Sustancias 1-5

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo representa la primera investigación biológica y fitoquímica de la especie *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum*.

El análisis de los métodos de extracción asistidos con energías alternas demostró que la extracción asistida por microondas provee mejores rendimientos con menores requerimientos de solventes y energéticos.

Los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antifúngica mostraron que los extractos obtenidos por microondas y ultrasonido de hojas de *Agave nussaviorum* presentan una actividad antibacteriana y antifúngica contra dermatofitos causantes de la onicomycosis como: *Tricophyton rubrum* y *Tricophyton mentagrophytes*. Además de inhibir el crecimiento de otros microorganismos como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Staphylococcus aureus*.

El análisis fitoquímico de las hojas de *Agave nussaviorum* por técnicas cromatográficas, espectrometría de masas y resonancia magnética evidenció la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos y fue identificada la inulubiosa por primera vez en la especie *Agave nussaviorum*.

Los resultados que exhibieron los extractos UAE y MAE en la actividad biológica y el análisis fitoquímico, demuestran que la especie *Agave nussaviorum* es una especie con un gran potencial químico y biológico que pueden tener aplicaciones importantes además de los usos medicinales tradicionales que ya presenta.

Con este trabajo es posible avalar el uso medicinal tradicional de los pobladores de San Pedro y San Pablo Teposcolula, al comprobar el efecto antifúngico y antimicrobiano de la especie *Agave nussaviorum*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, M. J., Ansuategui, M., & Bermejo, P. (2007). Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc* , 7, 116-145.
- Acharya, P., Genwali, G., & Rajbhandari, M. (2013). Isolation of catechin from acacia catechu willdenow estimation of total flavonoid content in *Camellia sinensis* Kuntze and *Camellia sinensis* Kuntze var. assamica collected from different geographical region and their antioxidant activities. *Scientific World* , 32-36.
- Ahumada-Santos, Y., Montes-Avila, J., Uribe-Beltrán, M., Díaz-Camacho, S., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., y otros. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products* , 49 , 143– 149.
- Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Saldaña Oyarzábal, I., Gill, C., & Rowland, I. (2013). An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe* , 38-44.
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., Hernández-Vargas, V., Ortega-Chávez, M., Orea-Lara, G., Cifuentes-Díaz de León, A., y otros. (2009). Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae) . *American Journal of Applied Sciences* , 1076-1085.
- Almaraz-Abarca, N., González-Elizondo, M., Graca-Campos, M., Ávila-Sevilla, Z., Delgado-Alvarado, EA. (2013). Variability of the foliar phenol profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). *Botanical Sciences* , 295-306.
- Alonso, J. (2007). *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. Rosario, Argentina: Corpus Editorial.
- Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2009). Ultrasonic vs. Microwave Extraction Intensification of Active Principles from Medicinal Plants. *AIDIC Conference Series* , 1-7.
- Ansari, M., Anurag, A., Fatima, Z., & Hameed, S. (2013). Natural phenolic compounds: A potential antifungal agent. *Formatex* , 1189-1195.
- Aqil, F., Zahin, M., Ahmad, I., Owais, M., Ahmad Khan, M., Bansal, S., y otros. (2010). Antifungal activity of medicinal plants extracts and phytochemicals: A review. En I. Ahmad, M. Owais, M. Shahid, & F. Aqil, *Combating Fungal Infections* (págs. 449-484). USA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Arenas, R. (2002). Dermatofitosis en México. *Revista Iberoamericana de Micología* , 19, 63-67.

Arias, T., Valverde, V., & Reyes, S. (2000). Las Plantas de la Región de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Instituto Nacional de Ecología* .

Barile, E., Bonanomi, G., Antignani, V., Zolfaghari, B., Sajjadi, E., Scala, F., y otros. (2007). Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry* , 68, 596-603.

Barros, M. S., Santos, D., & Hamdan, J. (2006). In vitro methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. *Mycological Research* , 1355–1360.

Bautista-Justo, M, García-Oropeza, L., Salcedo-Hernández, R., & Parra-Negrete, L. (2001). AZÚCARES EN AGAVES (Agave tequilana Weber) CULTIVADOS EN EL ESTADO DE GUANAJUATO. *Acta Universitaria* , 33-38.

Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., & Barbosa-Cánovas, G. (2011). Ultrasound applications in food processing. En H. Feng, G. Barbosa-Canovas, & J. Weiss, *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing* (págs. 65-105). NY: Food Engineering Series .

Bohm, B., Loo, T., Nicholls, K., & Plowman, T. (1988). Flavonoid variation in *Erythroxylum*. *Phytochemistry* , 833-837.

Bohm, B., Phillips, D., & Gaxders, F. (1981). Flavonoids of *Erythroxylum rufum* and *Erythroxylum ulei*. *Journal of Natural Products* , 676-679.

Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C., & Wenjuan, D. (2006). Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrasonics Sonochemistry* , 13, 511-516.

Candido Tietbohl, L. (2014). Estudo químico e biológico da espécie vegetal *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg. Niterói, Rio de Janeiro: UFF.

Casazza, A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. . *Journal of Food Engineering* , 50–55.

Chabasse, D., & Pihet, M. (2008). Les dermatophytes : les difficultés du diagnostic mycologique. Difficulties encountered in the mycological diagnosis of dermatophytosis. *Revue Francophone des Laboratoires* , 29–38.

Chan, C., Yusoff, R., Ngoh, G., & Kung, F. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography* , 1218, 6213– 6225.

Chen. PY., Kuo, YC., Chen, CH., Kuo, YH., Lee, CK. (2009). Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. *Molecules*, 1789-1795.

CLSI. (2009). Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. 10a. edición , 7-82.

CLSI. (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; *Approved Standard—Third Edition*. Wayne.

DaPorto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry* , 20, 1076–1080.

Davicino, R., Mattar, M. A., Casali, Y. A., Correa, S. G., Pettenati, E. M., & Micalizzi, B. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular argentina. *Revista Peruana de Biología* , 14 (2), 247-251.

Debnath, M., Pandey, M., Sharma, R., Thakur, G., & Lal, P. (2010). Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. *Journal of Medicinal Plants Research* , 177-187.

Delazar, A., Nahar, L., & Hamedeyazdan, S. (2012). Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods in Molecular Biology* , 864, 89-115.

Dimitrov, K., Kriaa, K., Hadrich, B., Kechaou, N., & Nikov, I. (2010). Kinetics of ultrasound assisted extraction of polyphenols from vegetal sources. *XXV Ars Separatoria*, 85-88.

Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* , 16 (4), 385-393.

Edwards, I. R., & Aronson, J. K. (2000). Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *The Lancet* , 356, 1255–59.

Faria, N., Kim, J., Goncalves, L., Martins, M., Chan, K., & Campbell, B. (2012). Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. *Letters in Applied Microbiology* , 506–513.

Fernández Anderson, L. (2005). Fitoquímica del *Agave salmiana*. Cholula: UDLAP.

Fernández-Torres, B., Cabañes, F., Carrillo-Muñoz, A., Esteban, A., Inza, I., Abarca, L., y otros. (2002). Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology* , 3999–4003.

Fothergill, A. (2012). Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods. En G. Hall, *Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents: How to Detect Resistance*. San Antonio , TX: G.S. Hall.

Gao, M., Song, B.-Z., & Liu, C.-Z. (2006). Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim cultured cells. *Biochemical Engineering Journal* , 79–83.

García-Martos, P., García-Agudo, L., Agudo-Pérez, E., Sola, F. G., & Linares, M. (2010). Dermatofitosis por hongos antropofílicos en Cádiz (1997–2008). *Actas Dermo-Sifiliográficas* , 242–247.

García-Mendoza, A. (2004). *Biodiversidad de Oaxaca* (1a. edición ed.). México: Redacta.

García-Mendoza, A. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias* , 14-23.

García-Mendoza, A. (2010). Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta botánica mexicana* , 71-93.

Garofulic, I., Dragovic-Uzelac, V., Jambrak, A., & Jukic, M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering* , 1-6.

Ghannoum, M., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Rinaldi, M., Lee-Yang, W., y otros. (2004). Intra and interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes. *Journal of Clinical Mycobiology* , 2977-2979.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, E. K., & Rahmat, A. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014 , 1-10.

González Mosquera, D. (2006). Evaluación fitoquímica y farmacológica del extracto acuoso de las hojas de la especie *Boldoa purpurascens*, Cav. La Habana: UNIVERSIDAD DE LA HABANA.

Grotewold, E. (2007). *The science of flavonoids*. Ohio: Springer Science.

Guerra, J. O., Meneses, A., Simonet, A., Macías, F., Nogueiras, C., Gómez, A., y otros. (2008). Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. *Revista de Biología Tropical* , 56 (4), 1645-1652.

Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., y otros. (2009). Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *J Med Microbiol* , 1074-1079.

Gupta, M. (1995). *Plantas medicinales Iberoamericanas*. Santa Fé de Bogotá: Presencia.

Hammuel, C., Yebpella, G., Shallangwa, G., Magomya, AM, & Agbajp, A. (2011). Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. *Acta Poloniae Pharmaceutica* , 535-539.

Hao, J., Han, W., Huang, S., Xue, B., & Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology* , 28, 191-196.

Háuard-Marroquín, L., Rodríguez Padilla, C., Franco, M., Castillo, P., Vázquez Alvarado, R., & Rojas, M. (2010). Propiedades terapéuticas de *Agave tequilana* Weber. *TOCTL Revista Internacional de ciencia y Tecnología Biomédica* , 1-7.

Hemwimol, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *13*, 543–548.

Hernández-Salazar, A., Carbajal-Pruneda, P., Fernández Martínez, R., & Arenas, R. (2007). Dermatitis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología* , 122-124.

Herrera, C., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., & Salazar, L. (2010). The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. *Ciencia e investigación agraria* , 75-84.

Hoentjen, F., Felling, G., Harmsen, H., Zhang, X., Snart, J., Tannock, G., y otros. (2005). Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflammatory Bowel Diseases* , 977–985.

Inglett, G., Rose, D., Chen, D., Stevenson, D., & Biswas, A. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) with or without microwave irradiation. *Food Chemistry* , 1216–1219.

Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., & Shukla, S. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents – An overview. *Asian Journal of Research in Chemistry* , 2 (1), 19-25.

Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S., & Winklerhausen, E. (2015 *In Press*). Application of ultrasounds for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. *Ultrasonics Sonochemistry* , 446-453.

Kalpana, K., Kapil, S., Harsh, P., & Bikram, S. (2008). Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 10129–10134.

Khan, KM., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem* , 851–858.

Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds . *Molecules* , 2328-2375.

Koc, A., Silici, S., Ayangil, D., Ferahbas, A., & Cankaya, S. (2005). Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses* , 205–210.

Koneman, E., & Allen, S. (2006). *Koneman. Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Kuo, C., Chen, B., Liu, Y., Deng, T., Chen, J., & Shieh, C. (2014). Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Polygonum cuspidatum*. *Molecules* 2014 , 67-77.

Lacasa, E. C., Mazuelos, E. M., & Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología* , 1-24.

Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., & Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry* , 130, 928-936.

Li, H., Pordesimo, L., & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from beans. *Food Research International* , 37, 731-738.

Li, T., Zhang, Z., Zhang, L., Huang, X., Lin, J., & Chen, G. (2009). An improved facile method for extraction and determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by focused microwave-assisted extraction coupled with GC-MS. *Journal of Separation Science* , 32, 4167-4175.

Liu, Z., Wang, J., Shen, P., Wang, C., & Shen, Y. (2006). Microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of ferulic acid from radix *Angelicae sinensis*. *Separation and Purification Technology* , 18-21.

Llambrich, A., & Lecha, M. (2002). Tratamiento actual de las onicomiasis. *Revista Iberoamericana de Micología* , 19, 127-129.

Longares-Patron, A., & Canizares-Macias, M. (2006). Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde from *Vanilla fragans*. *Talanta* , 882-887.

Lu, C., Wang, H., Lv, W., Ma, C., Lou, Z., Xie, J., y otros. (2012). Ionic liquid-based ultrasonic/microwave-assisted extraction combined with UPLC-MS-MS for the determination of tannins in *Galla chinensis*. *Natural Product Research* , 1842-1847.

Majinda, R. (2012). Extraction and isolation of saponins. *Methods in molecular biology* , 864 (415-426).

Makkar, H., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). Saponins. *Methods in Molecular Biology* , 393, 93-100.

Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalath, S. (2007). Microwave assisted extraction-an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Review* , 1 (1), 7-18.

Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L., Arenas, R., Hernández-Hernández, F., Millán-Chiu, B., Torres-Rodríguez, J., y otros. (2011). Levaduras causantes de onicomycosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. *Revista Iberoamericana de Micología* , 32-35.

Martínez Antonio, A., Martínez Cruz, M., De Jesus Palma, F., & Córdoba, F. (1995). La distribución, usos y algunas características químicas de los agaves de Oaxaca (México). *INTERCIENCIA* , 14-19.

Martínez Fernández, C., Carnot Uría, J., De Castro Arenas, R., Muñío Perurera, J., & Torres Iribar, W. (1998). Tratamiento de las micosis profundas. Estado actual. *Acta Médica* , 80-85.

Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria* , 271-278.

Milani, E., Koocheki, A., & Golimovahhed, Q. (2011). Extraction of inulin from Burdock root (*Arctium lappa*) using high intensity ultrasound. *International Journal of Food Science and Technology* 2011 , 1699-1704.

Mirzoeva, O., Grishanin, R., & Calder, P. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research* , 239-246.

Montañez-Soto, J. (1), Venegas González, J., Bernardino Nicanor, A., & Ramos Ramírez, E. (2011). Enzymatic production of high fructose syrup from *Agave tequilana* fructans and its physicochemical characterization. *African Journal of Biotechnology* , 19137-19143.

Montañez Soto, J. (2), Venegas González, J., Vivar Vera, M., & Emma, G. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber Azul. *Bioagro* , 199-206.

Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., & Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. . *Phytochemistry* , 2231-2234.

Murthy, P., Manjunatha, M., Sulochannama, G., & Madhava Naidu, M. (2012). Extraction, Characterization and Bioactivity of Coffee Anthocyanins. *European Journal of Biological Sciences* , 13-19.

Tatsimo, NS., de Dieu Tamokou, J., Havyarimana, L., Csupor, D., Frogo, P., Hohmann, J., y otros. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research Notes* , 1-6.

Osbourn, A. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* , 1821-1831.

Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *42*, 129-133.

Papadopoulou, C., Soulti, K., Roussis, IG. (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*, 41-46.

Pasetto, S., Young, K., & Murata, R. (2014). Antifungal Activity of Flavonoids Against *Candida albicans*. *Pharmacology/Therapeutics/Toxicology*, (págs. 1-2). Carolina del Norte, USA.

Perera Córdova, W., Gómez Matos, M., Tabart, J., Sipel, A., Kevers, C., & Dommes, J. (2012). In vitro characterization of antioxidant properties of cuban endemic varieties of *Erythroxylum alaternifolium* a. rich. isolation of two flavonol glycosides. *Journal of the Chilean Chemical Society* , 1340-1343.

Picó, Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* , 43, 84-96.

Pitt, J., & Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. North Ryde, Australia: Springer.

Primo, E. (2007). *Química orgánica básica y aplicada*. Valencia: Reverté.

Rodríguez, A., Carrillo-Reyes, P., & Castro-Castro, A. (2008). Nota sobre la distribución geográfica y morfología de *Manfreda involuta* (Agavaceae). *Acta Botánica Mexicana* (84), 17-23.

Rosler, K., & Goodwin, C. (1984). A General Use of Amberlite XAD-2 Resin for the Purification of Flavonoids from Aqueous Fractions. *Journal of Natural Products* , 188-188.

Rostagno, M., Palma, M., & Barroso, C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A* , 1012 (2), 119-128.

Hernández, RS., Lugo, EC., Díaz, LJ., & Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave lechuguilla Torrey. *e-Gnosis* , 3 (11), 1-9.

Sahu, N., Banerjee, S., Mondal, N. B., & Mandal, D. (2008). Steroidal saponins. *Fortschr Chem Org Naturst* (89), 45-141.

Saldívar, R. H., García, G. F., Castillo, F. D., Alvarado, R. G., Rodríguez, D. J., & Díaz, F. J. (2003). Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. Ex D.C.) Coville extracts from two mexican deserts against *Pythium* sp. Pringsh. *Revista Mexicana de Fitopatología* , 21 (2), 97-101.

Sánchez-Carazo, J. L., Obón-Losada, L., & Pont-Sanjuan, V. (1999). Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Revista Iberoamericana de Micología* , 16, 26-30.

Santos, D., & Hamdan, J. (2005). Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* , 1917–1920.

Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., & Gonzalez-Paramas, A. (2012). Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. En S. Sarker, & L. Nahar, *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology* (págs. 427,464). USA: Springer.

Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* , 3–8.

Song, J., Li, D., Liu, C., & Zhang, Y. (2011). Optimized microwaveassisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* , 282–287.

Souza, T., Santos, L., Moreira, R., & Rangel, V. (2005). Avaliacao da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Revista brasileira de farmacognosia* , 36-38.

Spigno, G., & De Faveri, D. (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering* , 93, 210–217.

Suarez-Lasso, E. (2010). Valoración in vitro de *Bocconia frutescens* L. contra *Trichophyton rubrum*. Comprobando la medicina tradicional. *Cultura y droga* , 15 (17), 47-58.

Sun, J. , Liang, F., Bin, Y., Li, P., Duan, C. (2007). Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules*, 679-693.

Taha, F., Mohamed, G., Mohamed, S., Mohamed, S., & Kamil, M. (2011). Optimization of the extraction of total phenolic compounds from sunflower meal and evaluation of the bioactives of chosen extract. *American Journal of Food Technology* , 1002–1020.

Teng, H., Ghafoor, K., & Choi, Y. (2009). Optimization of microwave-assisted extraction of active components from chinese quince using response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* , 52 (6), 694-701 .

Torres Moran, M., Infante, D., Sanchez, M., & Morales, A. (2005). Diversidad genética en *Agave tequilana* Weber var. azul proveniente de micropropagación. *Boletín Nakari* , 14.

Valdez, L. G. (2011). Obtención de un surfactante a partir de biomasa residual de *Agave durangensis* y su aplicación en la remoción de arsénico por la técnica de alomeración esférica. México DF: UPIBI-IPN.

Vanden-Bossche, H. (1997). Mechanisms of antifungal resistance. *Revista Iberoamericana de Micología* , 14, 44-49.

Veggi, P., Martínez, J., & Mireles, M. (2013). Fundamentals of Microwave Extraction. En F. Chemat, & G. Cravotto, *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds* (págs. 15-52). Italia.

Verástegui Montemayor, M. (2000). Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de agave y su acción sobre el tigmotropismo e dimorfismo de *Candida albicans*. Nuevo Leon: UANL.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry- A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* , 9 (2), 161-169.

Villar, M., & Villavicencio, O. (1992). Uso de plantas medicinales en el tratamiento del asma bronquial. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna* , 5 (4), 1-8.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* , 8, 303-313.

Wagner, H., & Bladt, S. (1995). *Plant Drug Analysis -A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin: Springer.

Wang, L., Qin, P., & Hu, Y. (2010). Study on the microwave-assisted extraction of polyphenols from tea. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* , 307-313.

Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., & Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* , 78, 693-700.

Wang, X., Wu, Q., & Wu, Y. (2012). Response Surface Optimized Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids from *Sparganii rhizoma* and Evaluation of Their in Vitro Antioxidant Activities . *Molecules* , 6769-6783.

Wesche, E. (2000). Química de Alimentos de Origen. *Universidad de las Américas - Puebla* .

Wu, Y., Wang, X., & Fan, E. (2012). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of puerarin and total isoflavones from *Puerariae lobatae Radix* (*Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi) with response surface methodology. *Phytochemical analysis* , 513-519.

Yadav, R., & Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology* , 3 (12), 10-14.

Yang, C., Zhang, Y., Jacob, M., Khan, S., Zhang, Y., & Li, X. (2006). Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* , 50 (5), 1710-1714.

- Yang, Y., Jin, M., Huang, M., Su, B., & Ren, Q. (2007). Ultrasound-Assisted Extraction of Soyasaponins from Hypocotyls, and Analysis by LC-ESI-MS. *Chromatographia* , 65 (9), 555–560.
- Yang, Y., Wei, M., Huang, T., Lee, S., & Lin, S. (2013). Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from Radix Scutellariae. *Industrial Crops and Products* , 45, 182-190.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., & Arango, A. C. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología* , 27 (2), 101-103.
- Zhang, Z., Zhang, Z., Zhang, X., Li, J., Wang, Y., & Zhao, C. (2010). An ultrasound-assisted extraction technology of almond dregs protein. *Frontiers of Agriculture in China* , 4 (1), 69–73.
- Zhao, S., Kwok, K., & Liang, H. (2006). Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from Radix Bupleuri. *Separation and purification technology* , 55, 307-312.
- Zhou, H., & Liu, C. (2006). Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography A* , 1129, 135–139.
- Zhu, J., & Fu, Q. (2012). Optimization of Ultrasound-assisted Extraction Process of Perilla Seed Meal Proteins. *The Food Science and Biotechnology* , 21 (6), 1701-1706.
- Zou, Y., Xie, C., Fan, G., Gu, Z., & Han, Y. (2010). Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* , 11, 611–615.